

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK: 636.7.09:616.993.19:57.083:616.15(043.3)

Urška Ravnik, dr. vet. med

PATOGENEZA IN IMUNSKI ODZIV PRI NARAVNI OKUŽBI PSOV Z
BAKTERIJO *Anaplasma phagocytophilum*

Doktorska disertacija

PATOGENESIS AND IMMUNE RESPONSE IN DOGS NATURALLY
INFECTED WITH THE *Anaplasma phagocytophilum* BACTERIUM

PhD Thesis

Ljubljana, 2012

Urška Ravnik

PATOGENEZA IN IMUNSKI ODZIV PRI NARAVNI OKUŽBI PSOV Z BAKTERIJO
Anaplasma phagocytophilum

Delo je bilo opravljeno na

Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, v.d.
predstojnika doc. dr. Alenka Seliškar, dr. vet. med.,

Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani,
predstojnik prof. dr. Srečko Koren, dr. med.,

Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo Veterinarske fakultete Univerze v
Ljubljani, predstojnica prof. dr. Silvestra Kobal, dr. vet. med.,

Inštitutu za zdravstveno varstvo perutnine Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
predstojnica prof. dr. Olga Zorman Rojs, dr. vet. med.,

Tigullio S.R.L., Laboratorio analisi chimico cliniche, Genova, vodja laboratorija dr. Claudi
Amassucco in v

Diagnostici Lanterni, Laboratorio analisi veterinarie, Genova, vodja laboratorija dr. Alberto
Franceschi

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne _____

Mentorica: prof. Nataša Tozon, dr. vet. med.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

predsednica: prof. Olga Zorman Rojs, dr. vet. med.

članica: prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol.

članica: prof. dr. Stanka Lotrič Furlan, dr. med.

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Urška Ravnik

VSEBINA

IZVLEČEK.....	11
1 UVOD	15
1.1 Namen raziskave	16
2 PREGLED LITERATURE	18
2.1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	18
2.2 Taksonomija.....	18
2.3 Epizootiologija in epidemiologija.....	20
2.4 Patogeneza	23
2.4.1 Vstop in razmnoževanje bakterije <i>Anaplasma phagocytophilum</i> v nevtrofilcih.....	24
2.4.2 Mehanizmi, s katerimi se bakterija <i>Anaplasma phagocytophilum</i> izogne naravni obrambi gostitelja	25
2.4.3 Odgovor gostitelja na okužbo z bakterijo <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	26
2.5 Klinična slika	27
2.6 Laboratorijske spremembe.....	28
2.7 Imunsko pogojene bolezni kot posledica okužbe z bakterijo <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	29
2.8 Ugotavljanje okužbe	31
2.8.1 Ugotavljanje povzročitelja.....	32
2.8.1.1 Pregled krvnega razmaza	32
2.8.1.2 Osamitev.....	33
2.8.1.3 Molekularne metode ugotavljanja bakterije <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	33
2.8.2 Ugotavljanje specifičnih protiteles proti bakteriji <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	34
2.9 Zdravljenje in preprečevanje bolezni.....	35
2.10 Anaplazmoza pri ljudeh	37
3 MATERIAL IN METODE.....	38
3.1 Zasnova študije	38
3.1.1 Retrospektivna študija	38
3.1.2 Prospektivna študija.....	38

3.2 Živali	38
3.3 Odvzem in priprava vzorcev	39
3.4 Ugotavljanje okužbe	39
3.4.1 Indirektni imunofluorescenčni test	40
3.4.2 Verižna reakcija s polimerazo	40
3.4.2.1 Določanje aminokislinskega in nukleotidnega zaporedja – sekveniranje	40
3.5 Ugotavljanje bolezenskih znakov in laboratorijskih sprememb	41
3.5.1 Klinični pregled	41
3.5.2 Hematološke preiskave	41
3.5.3 Biokemijske preiskave krvnega seruma	42
3.6 Ugotavljanje hiperglobulinemije	42
3.6.1 Elektroforeza serumskih proteinov v agaroznem gelu	42
3.7 Ugotavljanje cirkulirajočih imunskih kompleksov v krvi	42
3.7.1 Precipitacija imunskih kompleksov s polietilen glikolom	43
3.7.2 Nefelometrija z dvožarkovnim spektrofotometrom	43
3.8 Ugotavljanje prisotnosti in vrste proteinurije	45
3.8.1 Urinogram	45
3.8.2 Razmerje med proteini in kreatininom v urinu	45
3.8.3 Elektroforeza urinskih proteinov	45
3.9 Statistične metode	45
4 REZULTATI	47
4.1 Retrospektivna študija	47
4.1.1 Pogostost okužbe z bakterijo <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	47
4.1.2 Ugotavljanje specifičnih protiteles proti bakteriji <i>Anaplasma phagocytophilum</i> z IFA	47
4.1.3 Dokazovanje bakterije <i>Anaplasma phagocytophilum</i> s PCR	47
4.1.4 Porazdelitev glede na starost, spol in pasmo	48
4.1.5 Pojavnost kliničnih znakov	49
4.1.6 Hematološki parametri	52

4.1.7 Biokemijski parametri	52
4.1.8 Sočasna okužba z bakterijo <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	54
4.2 Prospektivna študija	54
4.2.1 Določanje aminokislinskega in nukleotidnega zaporedja - sekveniranje	54
4.2.2 Ugotavljanje trombocitopenije	54
4.2.3 Elektroforeza serumskih proteinov.....	57
4.2.4 Ugotavljanje cirkulirajočih imunskih kompleksov v krvi	62
4.2.5 Ugotavljanje prisotnosti in vrste proteinurije	64
4.2.5.1 Urinogram	64
4.2.5.3 Elektroforeza urinskih proteinov	65
5 DISKUSIJA.....	70
5.1 Retrospektivna študija.....	70
5.1.1 Pogostost okužbe z bakterijo <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	70
5.1.2 Indirektni imunofluorescenčni test in PCR	70
5.1.3 Demografski podatki	71
5.1.4 Pojavnost kliničnih znakov.....	71
5.1.5 Hematološke in biokemijske spremembe	72
5.1.6 Sočasna okužba z bakterijo <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	74
5.2 Prospektivna študija	74
5.2.1 Določanje aminokislinskega in nukleotidnega zaporedja - sekveniranje	74
5.2.2 Elektroforeza serumskih proteinov.....	75
5.2.3 Cirkulirajoči imunski kompleksi	76
5.2.4 Prisotnost proteinurije.....	77
5.2.5 Algoritem za diagnostiko anaplazmoze.....	79
5.2.6 Algoritem za klinično klasifikacijo in zdravljenje anaplazmoze.....	80
6 SKLEPI	82
7 POVZETEK.....	84
8 ZAHVALE	88

9 LITERATURA	89
10 PRILOGE	102

10.1 Zbirna tabela osnovnih kliničnih podatkov, koncentracije CIC-ov ($\mu\text{g}/\text{ml}$) in PLT ($\times 10^9/\text{l}$) serološko pozitivnih psov (+ prisoten; - odsoten; prazno polje – preiskava ni bila opravljena)	102
10.2 Zbirna tabela osnovnih kliničnih podatkov, koncentracije CIC-ov ($\mu\text{g}/\text{ml}$) in PLT ($\times 10^9/\text{l}$) PCR pozitivnih psov (+ prisoten; - odsoten; prazno polje – preiskava ni bila opravljena)	106
10.3 Zbirna tabela osnovnih kliničnih podatkov, koncentracije CIC-ov ($\mu\text{g}/\text{ml}$) in PLT ($\times 10^9/\text{l}$) psov v kontrolni skupini (+ prisoten; - odsoten; prazno polje – preiskava ni bila opravljena)	107

KAZALO TABEL

Tabela 1: Taksonomija erlihij.....	19
Tabela 2: Razdelitev kliničnih znakov v skupine glede na prizadeti organski sistem ali prisotni simptom	41
Tabela 3: Priprava raztopin za postopek nefelometrije	44
Tabela 4: Število in odstotek psov glede na IFA in/ali PCR pozitiven rezultat.....	47
Tabela 5: Pojavnost kliničnih znakov (%) glede na IFA titer in PCR	51
Tabela 6: Primerjava rezultatov hematoloških preiskav med skupinami okuženih psov (razdeljenih glede na IFA titer proti <i>A. phagocytophilum</i> ali PCR + rezultat) in kontrolno skupino psov	53
Tabela 7: Število trombocitov ($\times 10^9/\text{l}$) pri okuženih (razdeljenih v skupine glede na IFA titer ali PCR+ rezultat) in psih v kontrolni skupini (KS).....	55
Tabela 8: Rezultati elektroforeze serumskih proteinov (g/dl) (povprečje \pm standardna deviacija) pri skupinah z različnimi IFA titri, PCR + in kontrolni skupini.....	58
Tabela 9: Rezultati elektroforeze serumskih proteinov – število vzorcev s spremenjenimi frakcijami na elektroforetogramu glede na IFA in PCR	60
Tabela 10: Rezultati ugotavljanja CIC-ov ($\mu\text{g}/\text{ml}$), (povprečje \pm standardna deviacija) pri skupinah z različnimi IFA titri, PCR + in kontrolni skupini	62

Tabela 11: Rezultati preiskav pri vzorcih urina s cilindri v sedimentu.....	65
Tabela 12: Rezultati elektroforeze urinskih proteinov	67

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Porazdelitev PCR pozitivnih psov glede na IFA titer.....	48
Graf 2:Porazdelitev psov glede na starost	49
Graf 3: Porazdelitev psov glede na pasmo	49
Graf 4: Statistično značilna razlika v številu trombocitov med posameznimi skupinami	55
Graf 5: Statistično značilna povezava med številom trombocitov in pojavnostjo znakov akutnega infekcijskega sindroma	56
Graf 6: Statistično značilna povezava med številom trombocitov in pojavnostjo gastrointestinalih znakov.....	56
Graf 7: Statistično značilna povezava med številom trombocitov in pojavnostjo šepanja	57
Graf 8: Statistično značilna povezava med hipoalbuminemijo in trombocitopenijo	61
Graf 9: Statistično značilna povezava med hipo- α 1-globulinemijo in trombocitopenijo	61
Graf 10: Statistično značilna povezava med hipergamaglobulinemijo in trombocitopenijo ..	62
Graf 11: Primerjava koncentracije CIC-ov med posameznimi skupinami	63
Graf 12a in b: Statistično značilna povezava med koncentracijo CIC-ov in γ globulinov ter razmerjem A/G.....	63
Graf 13: Statistično značilna povezava med koncentracijo CIC-ov in prisotnostjo MMW....	69

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogeneza družine <i>Ehrlichiae</i> (Dumler in Walker, 2001)	20
Slika 2: Morula v granulocitu; <i>fotografija dr. N. Pusterla</i>	33
Slika 3: Morula v celici celične kulture; <i>fotografija dr.M. Petrovec</i>	33
Slika 4: Elektroforeza urinskih proteinov.	68

OKRAJŠAVE

AGG	s toploto agregirani γ globulini (angl. Heat-Aggregated Gamma-Globulin)
CD	označevalec pripadnosti (angl. Cluster of Differentiation)
CFU	kolonijska enota (angl. Colony Forming Unit)
CIC	cirkulirajoči imunski kompleksi (angl. Circulating Immune Complexes)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic Acid)
Hct	hematokrit
HMW	visokomolekularni proteini v urinu (> 76 kDa) (angl. High Molecular Weight)
IFA	imunofluorescenčni test (angl. Immunofluorescence Assay)
IFN- γ	interferon γ
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IHA	imunsko pogojena hemolitična anemija
IL	interlevkin
IMGN	imunokompleksni glomerulonefritis
IMT	imunsko pogojena trombocitopenija
LMW	nizkomolekularni proteini v urinu (< 66 kDa) (angl. Low Molecular Weight)
Lympho	limfociti
MMW	srednjemolekularni proteini v urinu (66 – 76 kDa) (angl. Middle Molecular Weight)
Mono	monociti
MPV	povprečna velikost trombocitov (angl. Mean Platelet Volume)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (angl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
Neutro	nevtrofilni granulociti
NK celice	celice naravne ubijalke (angl. Natural Killer Cells)
PBS	fosfatni pufer s soljo (angl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PDW	variacija trombocitov v velikosti (angl. Platelet Distribution Width)

PEG	polietilen glikol
PLT	trombociti (angl. Platelets)
PSGL-1	angl. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
RBC	eritociti (angl. Red Blood Cells)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. Ribosomal Ribonucleic Acid)
SCID	angl. Severe Combined Immunodeficiency
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (angl. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SPE	elektroforeza serumskih proteinov (angl. Serum Protein Electrophoresis)
Th celice	celice T pomagalke (angl. T Helper cells)
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α (angl. Tumor Necrosis Factor- α)
UPC	razmerje med proteini in kreatininom v urinu
WBC	bele krvne celice (angl. White Blood Cells)

PATOGENEZA IN IMUNSKI ODZIV PRI NARAVNI OKUŽBI PSOV Z BAKTERIJO *Anaplasma phagocytophilum*

IZVLEČEK

Ključne besede: Pes, bolezni; s klopi prenosljive bolezni; anaplastoma – imunologija – kri; patologija, klinična; hematološki testi; serologija; verižna reakcija s polimerazo; klinične laboratorijske tehnike; psi

Izhodišča: Okužba z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) pri psih izzove imunski odgovor, ki se kaže v širokem spektru kliničnih znakov in laboratorijskih odstopanj. Ti se razlikujejo glede na fazo bolezni. Poleg demografskih podatkov in ugotavljanja seroprevalence smo želeli z ugotavljanjem imunsko pogojenih patoloških sprememb določiti mehanizme nastanka teh odstopanj. Nadalje smo želeli ugotoviti morebitno razliko v pojavljanju kliničnih znakov pri okužbi z različno genetsko različico bakterije *A. phagocytophilum*. Naš končni cilj je bil z diagnostičnimi metodami, ki bi bile tehnično izvedljive v rutinski praksi, ugotoviti dejavnike, ki prispevajo k poteku bolezni, s čimer bi pripomogli k ustreznejšem odločanju o protokolu zdravljenja in spremljanju njegove uspešnosti v klinični praksi.

Material in metode: V retrospektivnem delu smo proučili klinične podatke 754 psov. V nadaljnjo raziskavo smo od testiranih vključili 553 psov, pri katerih je bila dokazana prisotnost specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum* in/ali prisotnost povzročitelja. Osredotočili smo se na pasmo, starost, spol ter morebitno sočasno okužbo z bakterijo *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi s.l.*). Pri 149 psih smo poleg omenjenih preverili še klinična in laboratorijska odstopanja v času ugotovitve anaplastome. V prospektivni delu smo vključili 34 delovnih psov in 204 naključne paciente. V tem delu smo proučevali imunski odziv z ugotavljanjem cirkulirajočih imunskih kompleksov, hiperglobulinemije in proteinurije. Kot kontrolno skupino smo uporabili 19 delovnih psov, ki so bili serološko in PCR negativni na bakterijo *A. phagocytophilum*. Preverili smo morebitno razliko v pojavnosti kliničnih znakov med obema genetskima različicama bakterije *A. phagocytophilum*, ki se pojavljata pri psih v Sloveniji.

V obeh delih smo živali razdelili v osem skupin, in sicer serološko pozitivni v različnih titrih (šest skupin), PCR pozitivni in kontrolna skupina (serološko ter PCR negativni). Pse znotraj

posameznih skupin smo primerjali s kontrolno skupino in med sabo v povezavi z izraženostjo bolezenskih znakov glede na prizadeti organski sistem, v povezavi s hematološkimi odstopanji, hiperglobulinemijo, prisotnostjo cirkulirajočih imunskih kompleksov ter prisotnostjo in vrsto proteinurije.

Rezultati: Pri psih v Sloveniji smo dokazali 73,8-odstotno pogostost okužbe z bakterijo *A. phagocytophilum*. 5,3 % psov je bilo PCR pozitivnih. Prevladovali so samci (56,4 %), povprečna starost je bila 5,7 let. Med čistokrvnimi pasmami so bili najpogosteje okuženi zlati prinašalci (8,3 %). V 30,1 % smo potrdili sočasno okužbo z bakterijo *B. burgdorferi* s.l.. Prevladujoči klinični znaki v vseh skupinah so bili znaki akutnega infekcijskega sindroma (povišana telesna temperatura, letargija in anoreksijska) ter šepanje in gastrointestinalni znaki. Najizrazitejše hematološko odstopanje je bila trombocitopenija, ki se je pojavila v vseh skupinah z izjemo skupine z IFA titrom $> 1:2048$, biokemijsko pa povišanje aktivnosti alkalne fosfataze. Primerjava pojavnosti kliničnih znakov med genetskima različicama bakterije *A. phagocytophilum* je pokazala statistično značilno višje pojavljanje akutnih znakov pri različici H, ki okužuje pse in ljudi. Elektroforeza serumskih proteinov ni pokazala statistično značilne disproteinemije v primerjavi med okuženimi in kontrolno skupino. Statistično značilne povezave smo ugotovili med koncentracijo cirkulirajočih imunskih kompleksov in trombocitopenijo, hipergamglobulinemijo ter znižanim razmerjem med albumini in globulini. Neselektivna glomerularna proteinurija je bila prisotna v 17,7 % primerov in ni bila povezana z višino IFA titra ali pozitivnim rezultatom PCR.

Zaključek: Anaplazmoza najverjetneje poteka kot akutna bolezen in ne preide v kronično fazo. Višina IFA titra protiteles sama po sebi ne zadostuje za odločitev glede zdravljenja, ampak mora pozitiven IFA titer spremljati trombocitopenija in/ali klinična slika, saj akuten potek bolezni sproži vrsto imunskih mehanizmov, ki pripelje do pojava trombocitopenije in kliničnih znakov bolezni. Naša raziskava dopušča možnost razvoja imunokompleksnega glomerulonefritisa in akutizacije bolezni po perzistentni okužbi, vendar je bilo število vzorcev, ki bi to lahko potrdili, premajhno in tako ostaja predmet nadaljnjih raziskav.

PATHOGENESIS AND IMMUNE RESPONSE IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH THE *Anaplasma phagocytophilum* BACTERIUM

ABSTRACT

Key words: Dog diseases; tick-borne diseases; anaplasmosis – immunology – blood; pathology, clinical; hematologic tests; serology; polymerase chain reaction; clinical laboratory techniques; dogs

Background: Infection with the *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) bacterium in dogs results in a wide variety of clinical signs and laboratory changes which differ according to the phase of the disease. Our goal was to evaluate seroprevalence of *A. phagocytophilum* in dogs together with basic demographics as well as to try to understand the mechanism behind the clinical changes by studying immune mediated pathological factors. We were looking for potential differences in the clinical manifestation of the disease in the case of infection with a different *A. phagocytophilum* strain. Our main goal was to detect factors which play a role in the development of the disease by diagnostic methods which could be applied in a routine diagnostic work in order to improve a treatment protocol and the follow-up.

Material and methods: In the retrospective part, medical charts of 754 dogs were studied, of which 553 dogs which were seropositive and/or PCR positive to *A. phagocytophilum* were included further on in the study. The points of interest included breed, age, gender and the *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi s.l.*) coinfection. In 149 dogs, clinical and laboratory changes were established at the time of diagnosing anaplasmosis.

The prospective part included 34 working dogs and 204 random patients with the confirmed infection. Immune response was studied by establishing circulating immune complexes, hyperglobulinemia and proteinuria. The control group included 19 working dogs which were seronegative and PCR negative to *A. phagocytophilum*.

Results: We demonstrated 73.8 % prevalence of *A. phagocytophilum* infection in dogs in Slovenia. 5.3 % of the dogs were PCR positive. Males were overrepresented (56.4 %) and the mean age of infected dogs was 5.7 years. Infection most frequently occurred in Golden

Retrievers (8.3 %). Coinfection with *B. burgdorferi s.l.* was confirmed in 30.1 % of the dogs. Clinical signs of the acute infection syndrome including elevated body temperature, lethargy, anorexia, lameness and gastrointestinal signs were more prevalent in all groups. The most typical hematological abnormality was thrombocytopenia which did not occur in the group with the IFA titre > 1:2048. Biochemical abnormalities were limited to a slight increase of the alkaline phosphatase activity. From the statistical significance point of view, the infection with the H genetic variant, which infects both dogs and humans, more frequently resulted in acute signs of the disease. Serum protein electrophoresis did not reveal a statistically significant dysproteinemia in infected dogs compared to the control group. However, we demonstrated a statistically significant correlation between the concentration of circulating immune complexes, thrombocytopenia and lower albumin to globulin ratio with hypergammaglobulinemia. Non-selective glomerular proteinuria occurred in 17.7 % of the cases and was not in correlation with the amount of the IFA titre nor the PCR positive result.

Conclusion: Anaplasmosis is most likely an acute disease which does not progress to a chronic phase. One cannot make a decision about starting the treatment based on the amount of the IFA titre alone, but the positive IFA titre must be accompanied by thrombocytopenia and/or typical clinical signs because an acute course of the disease triggers numerous immunological mechanisms which result in the development of thrombocytopenia and clinical signs of the disease. Our study allows the possibility of the development of an immune-mediated glomerulonephritis and acutization of the disease after a persistent infection, but the number of samples suggesting that was too small and this remains to be investigated.

1 UVOD

Okužba z različnimi rikecijami iz družine *Anaplasmataceae* po klinični simptomatiki in laboratorijskih odstopanjih v akutni fazi poteka precej podobno. Čeprav se tarčne celice teh bakterij razlikujejo – od monocitnih do granulocitnih krvnih celic in trombocitov – so pri vseh hematološke spremembe precej podobne (Harrus in Waner, 2005). Prav tako klinični znaki – v akutni fazi prevladujejo znaki akutnega infekcijskega sindroma z letargijo, povišano telesno temperaturo in inapetenco (Harrus in Waner, 2005; Greig in sod., 2006; Kohn in sod., 2008). Glede na dosedanje raziskave se sklepa, da je večina posledic okužbe z rikecijami imunsko pogojenih (Day, 2008; Harrus in sod., 2001; Vaden in Grauer, 2011; Komnenou in sod., 2007). Opisuje se imunokompleksi glomerulonefritis, uveitis, poliartritis, imunsko pogojena hemolitična anemija in imunsko pogojena trombocitopenija (Harrus in sod., 2001). Vendar je večina poročil vezana na okužbo z bakterijo *Ehrlichia canis* (*E. canis*), medtem ko so poročila o imunsko pogojenih boleznih kot posledice okužbe z bakterijo *A. phagocytophilum* redka. Sklepali smo, da so mehanizmi nastanka teh posledic pri anaplastozni podobni kot pri monocitni erlihiozi, zato smo raziskavo usmerili v dokazovanje hipergamaglobulinemije, detekcijo cirkulirajočih imunskih kompleksov in proteinurije. Pri monocitni erlihiozi je potek bolezni po inkubacijski dobi dobro definiran, in sicer poteka v zaporednih fazah: akutni, subklinični in kronični. Psi, ki niso ali so nepravilno zdravljeni v akutni fazi, preidejo v subklinično fazo, v kateri lahko spontano ozdravijo, lahko ostanejo perzistentni prenašalci ali pa preidejo v kronično fazo. Dejavniki, ki vplivajo na potek bolezni, zaenkrat ostajajo neznani (Harrus in Waner, 2005). Pri anaplastozni je akutna faza definirana kot pojav akutnega infekcijskega sindroma (Alleman in sod., 2006). Nadalje je opisana perzistentna in subklinična okužba (Egenvall in sod., 2000; Alleman in sod., 2006; Alleman in sod., 2007), na katero lahko sklepamo iz visoke specifične seroprevalence pri klinično zdravih psih na endemičnih področjih. Ciklični pojav kliničnih primerov anaplastoze, ki nastopi v sezoni povečane aktivnosti klopor, potrjuje, da je anaplastozna akutno obolenje (Egenvall in sod., 1998; Greig in Armstrong, 2006). Kronična okužba naj ne bi bila neposredno povezana z nastopom klinične bolezni. Z našo študijo smo želeli ovrednotiti pomen kronične antigenske stimulacije pri serološko pozitivnih psih brez specifičnih kliničnih znakov in s tem utemeljiti spremljanje pacienta z dokazano okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum*, predvsem spremljanje ledvične funkcije, kjer lahko z laboratorijskimi preiskavami dokažemo patologijo pred nastopom kliničnih znakov.

Imunski odgovor na okužbo je v veliki meri odvisen od posameznikovega imunskega sistema, načina inokulacije, različnih sevov povzročitelja in pogojev bivanja. V naši raziskavi smo proučevali naravno okužene pse, zato je bil pri vseh način inokulacije enak, in sicer preko ugriza okuženega klopa. Glede na to, da smo raziskavo izvedli na lastniških psih, ki so bili zaradi različnih vzrokov pripeljani na Kliniko za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete, lahko sklepamo, da psi živijo v primernih pogojih, ki nimajo neposrednega negativnega vpliva na potek bolezni. Ker sta v Sloveniji po dosedanjih raziskavah prisotni dve genetski različici bakterije *A. phagocytophilum*, ki okužuje pse, smo na manjšem številu pacientov skušali ugotoviti razliko med njima. V svetu je prisotnih pet sevov *A. phagocytophilum*, njihov vpliv na patogenezo anaplazmoze pa je slabo raziskan (Carrade in sod., 2009). Morebitna razlika v poteku bolezni pri okužbi z različno genetsko različico bi lahko v klinični praksi služila kot napovedni dejavnik za potek in izid bolezni pri določenem pacientu.

1.1 Namen raziskave

Z raziskavo smo želeli:

- ugotoviti seroprevalenco anaplazmoze pri psih v Sloveniji z uporabo sodobnih diagnostičnih metod (IFA in PCR)
- ugotoviti klinične znake anaplazmoze in odstopanja v laboratorijskih parametrih
- ugotoviti mehanizme nastanka določenih odstopanj, pri čemer smo se osredotočili na ugotavljanje imunsko pogojenih patoloških sprememb
- ugotovitve uporabiti v klinični praksi, z namenom ustreznejšega odločanja o protokolu zdravljenja in spremljanju njegove uspešnosti.

Namen raziskave je bil preveriti zapisane hipoteze:

1. Pri psih v Sloveniji zelo pogosto ugotavljamo prisotnost specifičnih protiteles proti *A. phagocytophilum*. Ugotovljeni klinični znaki ter odstopanja v nekaterih laboratorijskih parametrih pri serološko in/ali PCR pozitivnih psih so posledica aktivne okužbe ali kronične prisotnosti povzročitelja.

2. Večina kliničnih znakov ter odstopanja v nekaterih laboratorijskih parametrih so posledica gostiteljevega imunskega odgovora na prisotnost povzročitelja.

3. Spremljanje nekaterih imunskih dejavnikov je mogoče uporabiti za ustrezeno izbiro zdravljenja in spremljanje njegove učinkovitosti.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 *Anaplasma phagocytophilum*

Povzročiteljica granulocitne erlihioze ali anaplastoze pri psih in tudi pri mačkah je *Anaplasma phagocytophilum comb. nov* (*A. phagocytophilum*), ki po spremenjeni taksonomiji iz leta 2001 (Dumler in Walker, 2001) združuje prej ločene vrste *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* in *humano granulocitno erlihijo* (HGE).

A. phagocytophilum je obligatno znotrajcelična bakterija, ki okužuje granulocite (Björsdorff, 2005; Lilliehöök in sod., 1998; Bakken in Dumler, 2000; Lepidi in sod., 2000). Zunanja celična stena je ultrastruktурno podobna celični steni gram-negativnih bakterij. Je edini poznani mikroorganizem, ki vstopa in se razmnožuje v nevtrofilcih (Allen, 2003). Prvič je bila opisana pri ovci na Škotskem leta 1930 (Foggie, 1951). Med letoma 1950 in 1960 so o omenjenem mikroorganizmu, povzročitelju »pašne mrzlice« pri govedu, poročali v Veliki Britaniji in na Finskem. Prvo poročilo o okužbi z bakterijo *A. phagocytophilum* pri psih prihaja iz Kalifornije leta 1982 (Madigan in Gribble, 1987). Anaplastoze pri mačkah je bila prvič opisana na Švedskem, v poznih devetdesetih pa so o primerih okužb mačk poročali tudi v Veliki Britaniji, na Danskem in v Severni Ameriki (Björsdorff, 2005). Prvi primer humane granulocitne erlihioze v Evropi je bil potrjen leta 1997 v Sloveniji (Petrovec in sod., 1997; Strle, 2004). Prvi primer anaplastoze pri psu pa je bil pri nas ugotovljen in opisan leta 1998 (Tozon in sod., 2003).

2.2 *Taksonomija*

Reklasifikacija erlihij je bila narejena na osnovi filogenetske analize genskih sekvenč (molekularnih analiz dveh genomskeh regij: bakterijske 16S rRNA in *groESL* genske sekvenč) (Harrus in Waner, 2005).

V red *Rickettsiales* sta bili tako uvrščeni dve družini: družina *Rickettsiaceae* z rodovoma *Rickettsia* in *Orientia* ter družina *Anaplasmataceae* z rodovi *Ehrlichia*, *Anaplasma* in *Neorickettsia* (Greig in Armstrong, 2006).

Tabela 1: Taksonomija erlihij

red	RICKETTSIALES					
družina	RICKETTSIACEAE			ANAPLASMATACEAE		
rod	<i>RICKETTSIA</i>	<i>ORIENTIA</i>	<i>EHRLICHIA</i>	<i>ANAPLASMA</i>	<i>NEORICKETTSIA</i>	

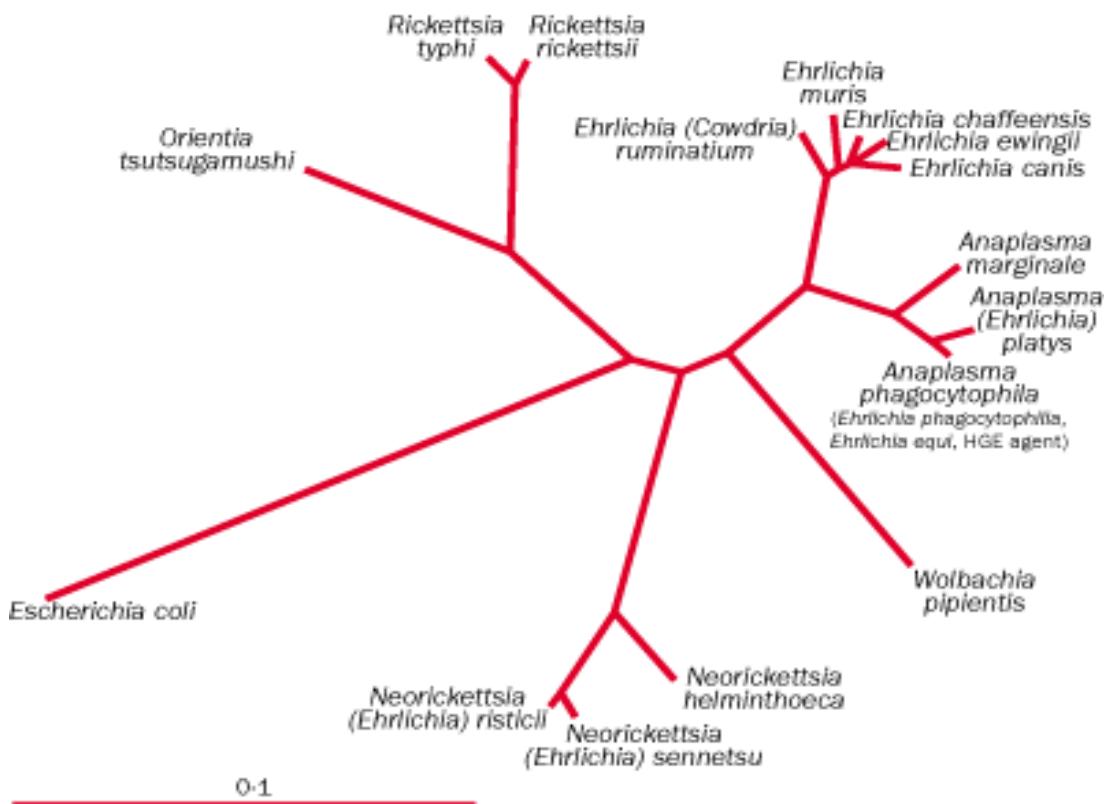
Predstavniki v rodu *Ehrlichia* in *Anaplasma* so s klopi prenosljive, znotrajcelične, gram-negativne bakterije, za razliko od bakterij v rodu *Neorickettsia*, ki se ne prenašajo s klopi.

E. canis je bila odkrita in prvič opisana kot povzročiteljica monocitne erlihioze pri psih že leta 1935 (Harrus in Waner, 2005). Psi se lahko okužijo tudi z bakterijo *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*), povzročiteljico monocitne erlihioze pri človeku, prvič izolirano 1991, in z bakterijo *Ehrlichia ewingii* (*E. ewingii*), povzročiteljico granulocitne erlihioze pri psih, ki je bila do sedaj dokazana le v ZDA. *E. ewingii* je genetsko (na osnovi 16S rRNA genske sekvence) zelo sorodna bakterijama *E. chaffeensis* (98,1 %) in *E. canis* (98,0 %) (Harrus in Waner, 2005).

Rod *Anaplasma* vključuje vrsti *A. phagocytophilum* in *Anaplasma platys* (*A. platys*). *A. phagocytophilum* povzroča granulocitno erlihiozo pri psih in tudi drugih vrstah živali, predvsem ovkah, konjih, govedu, redkeje pri mački. *A. platys* povzroča infekcijsko ciklično trombocitopenijo psov.

Rod *Neorickettsia* vključuje vrsto *Neorickettsia risticii* (*N. risticii*), povzročiteljico Potomac konjske mrzlice, o kateri so do sedaj poročali le v ZDA. Podobno le v ZDA poročajo o nekaterih drugih vrstah, ki lahko okužijo tudi pse. Mačke so dovetne za eksperimentalno okužbo z bakterijo *N. risticii*, poročajo pa tudi o seroloških dokazih naravne okužbe (Harrus in Waner, 2005).

Slika 1 prikazuje filogenetsko deblo, iz katerega je razvidna umeščenost *A. phagocytophilum*.

Slika 1: Filogeneza družine *Ehrlichiae* (Dumler in Walker, 2001)

2.3 Epizootiologija in epidemiologija

Bakterijo *A. phagocytophilum* primarno prenašajo klopi iz družine *Ixodidae*, in sicer *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) v Evropi, *Ixodes pacificus* in *Ixodes scapularis* v ZDA ter *Ixodes persulcatus* in *Dermacentor silvarum* v Aziji (Cao in sod., 2000; Richter in sod., 1996; Telford in sod., 1996). Tudi drugi *Ixodes* spp klopi – *Ixodes trianguliceps*, *Ixodes hexagonus* in *Ixodes ventalloi* – naj bi bili vključeni v prenos bakterije *A. phagocytophilum* v Evropi (Bown in sod., 2008; Santos in sod., 2009; Nijhof in sod., 2007). *A. phagocytophilum* preživi del svojega življenskega ciklusa v klopu in se prenaša skozi razvojne oblike klopa, medtem ko transovarialni prenos ni mogoč (Bakken in Dumler, 2000). Ker se klopi hranijo z večmesečnimi prekinitvami, so patogeni v njih v obdobju med obrokomoma večinoma v neinfektivni obliki. Fenomen reaktivacije patogena v klopu je bil prvič opisan pri rikeciji, ki povzroča vročico Skalnega pogorja. Kasneje so podoben proces opisali pri povzročitelju babezioze in lymske borelioze (Purnell in Joyner, 1968; Ribeiro in sod., 1987). Pri reaktivaciji

patogena v klopu pride do zapletenih bioloških sprememb, ki so najverjetneje posledica dviga temperature v klopu po zaužitju krvi gostitelja (Katavolos in sod., 1998). Tudi za klope, okužene z bakterijo *A. phagocytophilum*, velja, da niso kužni, dokler se ne hranijo na gostitelju vsaj en dan. Katavolos je s sodelavci dokazala, da obstaja minimalna infektivna doza za bakterijo *A. phagocytophilum* in dokler ni dosežena, ne pride do okužbe ali serokonverzije. To v eksperimentalnih pogojih traja minimalno 30 ur (Katavolos in sod., 1998). Ta interval se lahko razlikuje pri odraslih klopih in nimfah, saj se odrasel klop hrani na gostitelju 7–9 dni, nimfa pa 3–4 dni. Raziskovalci dopuščajo možnost, da se ta interval skrajša pri naravno okuženih klopih v okolju, kjer so izpostavljeni okoljskim vplivom, predvsem nenadnemu povišanju temperature, ki lahko spodbudi reaktivacijo patogena v klopu. Omenjena raziskava je potekala na miših, kar omejuje prenos izsledkov na pse, saj najverjetneje obstaja razlika med infektivno dozo za miši in pse.

Ker so klopi iz družine *Ixodidae* prenašalci več patogenih mikroorganizmov, kot so anaplazma, erlihija, borelija, bartonela, rikecija, babezija in arbovirusi, je možna sočasna okužba z dvema ali več povzročitelji. Sočasna okužba vpliva na razvoj in izrazitost kliničnih znakov in drugih patoloških sprememb. Dokazano je bilo, da klopi, okuženi z bakterijama *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi s.l.*, prenašajo oba povzročitelja občutljivemu gostitelju enako učinkovito kot klopi, okuženi le z enim povzročiteljem. Prav tako prisotnost enega povzročitelja v klopu ne vpliva na okužbo z drugim povzročiteljem iz okuženega gostitelja (Björsdorff, 2005). Ker imata *B. burgdorferi s.l.* in *A. phagocytophilum* v veliki meri iste rezervoarje in vektorje, ni presenetljivo, da se geografska področja, kjer je anaplazmoza endemična, prekrivajo s področji, kjer je razširjena tudi borelioza (Björsdorff, 2005).

Rezervoar bakterije *A. phagocytophilum* so različni mali glodalci, kot so miši, krti, voluharji, veverice, podgane ter divjad. Vse več je dokazov, da nekateri sevi bakterije *A. phagocytophilum*, ki so prisotni med glodalci, niso sposobni okužbe drugih vrst živali (Foley in sod., 2008). V Sloveniji sta pri jelenjadi in srnjadi opisani dve genetski liniji *groESL* operona iz izolata bakterije *A. phagocytophilum*, ki pa se razlikujta od genetske različice, ki okužuje ljudi (Petrovec in sod., 2002). Nasprotno pa so pri divjih prašičih našli bakterijo iz rodu *Anaplasma*, ki je imela 100-odstotno homologne *groESL* sekvence bakteriji *A. phagocytophilum*, ki okužuje ljudi in klope v Sloveniji (Strasek Smrdel in sod., 2009). To odkriva potencialni zoonotični cikel bakterije *A. phagocytophilum* med klopom *I. ricinus*, divjim prašičem in človekom v Evropi.

Psi in ljudje so naključni gostitelji. Bakteriemija pri njih traja kratek čas in zato niso pomembni v prenosu bakterije *A. phagocytophilum* na druge gostitelje (Bakken in Dumler, 2008). Raziskava v Sloveniji je pokazala, da je približno 15,4 % ljudi serološko pozitivnih na bakterijo *A. phagocytophilum* (Čižman in sod., 2000). Med ljudmi, ki so izpostavljeni kontaktu s psi, in tistimi, ki takega kontakta nimajo, ni razlike v prevalenci protiteles (Skerget in sod., 2003). Redko pride do prenosa bakterije *A. phagocytophilum* v odsotnosti klopa. Leta 2008 so poročali o primeru nosokomialne okužbe na Kitajskem, kjer naj bi do prenosa prišlo z neposrednim stikom s krvjo in respiratornimi izločki človeka, ki je umrl zaradi anaplastoze (Zhang in sod., 2008). Poročilo iz ZDA poroča o pojavu anaplastoze pri treh odraslih, ki so odirali divjad in naj ne bi bili izpostavljeni ugrizu klopa. Do okužbe naj bi prišlo zaradi neposrednega kontakta z okuženo krvjo divjadi, vendar so kasnejše raziskave pokazale, da se sev, ki okužuje srne v ZDA, razlikuje od seva, ki okužuje ljudi (de la Fuente in sod., 2005; Massung in sod., 2005). Perinatalna okužba je bila opisana v enem primeru pri psici z zaostalimi, mumificiranimi plodovi. Pri preživelih mladičih v leglu ni prišlo do okužbe, vendar raziskava dopušča možnost transplacentarnega prenosa v primeru okužbe v času brejosti (Plier in sod., 2009).

Seroprevalenca za bakterijo *A. phagocytophilum* pri psih je bila ugotovljena v državah po celem svetu, s pomankanjem dokazov za prisotnost bakterije *A. phagocytophilum* na južni polobli (Carrade in sod., 2009). Seroprevalenca v ZDA in Evropi je 55- oziroma 50-odstotna (Beall in sod., 2008; Barutzki in sod., 2006). Ker obstaja navzkrižna reaktivnost med bakterijo *A. phagocytophilum* in drugimi vrstami iz rodu *Anaplasma* ter *Ehrlichia* (Waner in sod., 1998), seropozitiven rezultat ni nujno odraz izpostavljenosti bakteriji *A. phagocytophilum*. To ne velja za Slovenijo, saj je po sedanjih podatkih tu prisotna zgolj ena vrsta anaplastoze, in sicer *A. phagocytophilum*, prav tako do danes še ni bila dokazana prisotnost vrst iz rodu *Ehrlichia*.

Identificiranih je pet genetskih različic bakterije *A. phagocytophilum* pri psih; razlikujejo se v enem do dveh nukleotidih v 16S rRNA na poziciji 54, 84, 86 in 120 (Poitout in sod., 2005). Razlike v patogenosti med posameznimi sevi so slabo raziskane.

Dejavnike tveganja za okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum* pri psih predstavljajo letni čas, življenjski slog in sočasna okužba z drugimi s klopi prenosljivimi mikroorganizmi. Najpogosteje okužbo pri psih dokažemo v toplejših mesecih leta, kar sovpada z aktivnostjo

nimf in odraslih klopor. Egenval in sodelavci (2000) so dokazali naraščanje deleža seropozitivnih psov z naraščanjem starosti, kar odraža povečano verjetnost izpostavitve skozi čas. V raziskavi, opravljeni na Švedskem, najdemo ugotovitev, da je za okužbo potrebna večkratna izpostavitev okuženim klopom in imunsko zrel gostitelj, saj so bolezen dokazali le pri psih, starejših od 18 mesecev (Egenval in sod., 1997). Naši rezultati so v nasprotju s tem: najmlajši pes, pri katerem je bila ugotovljena anaplazmoza, je bil star 6 mesecev (Ravnik in sod., 2010).

2.4 Patogeneza

Patogeneza anaplazmoze zaenkrat še ni docela pojasnjena. Bakterija se na gostitelja prenese prek okužene slino klopa. Po prehodu skozi dermis se razširi po organizmu hemato- in/ali limfogeno ter vstopi v tarčne celice (granulocite, predvsem nevtrofilne levkocite) (Dumler in Bakken, 1995). Z osamitvijo bakterije *A. phagocytophilum* iz promielocitne levkemične celične linije, HL60, so dokazali, da vstopa ne samo v zrele mieloidne celice, ampak tudi v progenične celice kostnega mozga (Herron in sod., 2000).

V gostiteljevi celici preživi znotraj citoplazemskih vakuol, v katerih se razmnožuje z binarno delitvijo in tvori inkluzijska telesca, imenovana morule. V nezdravljenih živalih lahko ugotovimo morule v cirkulirajočih nevtrofilcih en do dva tedna po okužbi (Björsdorff, 2005).

Pri okužbi z bakterijo *A. phagocytophilum* je več kot 95 % okuženih celic zrelih nevtrofilcev. Vendar so pri huje okuženih živalih lahko povzročitelji prisotni tudi v drugih celicah, naprimer fibroblastih, endotelnih celicah in mononuklearnih fagocitih. Približno 90 % okuženih nevtrofilcev se nahaja v krvnem obtoku, predvsem v sinusoidah rdeče pulpe v vranici ter v mikrocirkulaciji pljuč. Te celice so najverjetneje cirkulirajoči nevtrofilci, saj so jih dokazali tudi v žilah drugih organov brez mikroskopsko vidnih sprememb. Občasno se okuženi nevtrofilci pojavljajo tudi v sinusoidah jeter, v kostnem mozgu, ledvičnih glomerulih, kapilarah srca, žilah možganskih ovojnici, možganskih kapilarah in nadledvičnih žlezah (Lepidi in sod., 2000).

2.4.1 Vstop in razmnoževanje bakterije *Anaplasma phagocytophilum* v nevtrofilcih

A. phagocytophilum je edini poznani mikroorganizem, ki vstopa in se razmnožuje v nevtrofilcih. Tropizem za te celice lahko delno pojasnimo s tem, da sta vezava in endocitoza bakterije *A. phagocytophilum* posredovani s PSGL-1, ki služi kot receptor. Ta protein se v velikih količinah nahaja na odraslih nevtrofilcih in nediferenciranih celicah HL60. Zmožnost razmnoževanja bakterije *A. phagocytophilum* v celicah HL60 in odraslih nevtrofilcih kaže na to, da so tako odrasli nevtrofilci kot njihovi prekurzorji lahko rezervoarji mikroorganizma *in vivo* (Allen, 2003).

PSGL-1 ima pomembno vlogo v zgodnji fazi vnetja, ko se veže s P-selektinom na aktiviranih trombocitih in endotelnih celicah ter tako omogoči lepljenje levkocitov na endotel vnetega tkiva in izstopanje levkocitov iz žil (Carlyon in Fikrig, 2003). Nevtrofilci, ki so okuženi z bakterijo *A. phagocytophilum*, na svoji površini prenehajo izražati PSGL-1 in se zato ne zlepijo z endotelnimi celicami. To naj bi olajšalo prehod okuženih nevtrofilcev iz periferne krvi v klopa (Sukumaran in sod., 2005).

Dokaz, da je za adhezijo bakterije odgovoren sialil Lewis x tetrasaharid (sLe^x), specifičen receptor pa je PSGL-1, fukoziliran z α -(1,3) fukoziltransferazo (Fuc-TVII), izražen na nevtrofilcih, so dobili s preučevanjem učinka monoklonalnih protiteles (monoclonal antibody - mAb) proti sLe^x , proti sLe^x podobnim proteinom (CD43, CD16, CD24) in proti PSGL-1. V *in vitro* poskusih so dokazali, da mAb PL1 in mAb KPL-1, uperjena proti vezičem za P-selektin na PSGL-1, preprečijo vezavo bakterije *A. phagocytophilum* na celico, medtem ko mAb PL2, uperjena proti membranskemu epitopu PSGL-1, ne preprečijo vezave. S tem so dokazali, da je vezava bakterije *A. phagocytophilum* na PSGL-1 na levkocitih nujna za vstop bakterije v celico. Vendar pa tudi samostojno izražen PSGL-1 ne predstavlja popolnega receptorja. To dokazuje transfekcija B limfoblastoidne celične linije, ki sicer ne izraža ne PSGL-1 ne Fuc-TVII/ sLe^x in je tako nedovzetna za okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum*. Celice, ki so po transfekciji izražale samo PSGL-1, niso vezale bakterije *A. phagocytophilum* na svojo površino. Celice, ki so izražale Fuc-TVII, so vezale nekaj bakterij, vendar so bile še vedno odporne na okužbo. Samo dvojno transficirane celice, ki so izražale PSGL-1 in Fuc-TVII, so bile sposobne vezave bakterije, ki ji je sledil vstop v celico (Herron in sod., 2000; Goodman in sod., 1999).

Bakterijski ligand za PSGL-1 zaenkrat ostaja še nepojasnjen. Ta ligand predstavlja potencialni vir za razvoj zaščitne vakcine proti okužbi z bakterijo *A. phagocytophilum*, poleg tega pa bi lahko služil kot molekularni model za razvoj neselektinskega liganda za PSGL-1, ki bi ga lahko uporabili kot farmakološki inhibitor vezave bakterije na celico (Herron in sod., 2000).

2.4.2 *Mehanizmi, s katerimi se bakterija Anaplasma phagocytophilum izogne naravni obrambi gostitelja*

A. phagocytophilum alternira med dvema oblikama: manjšimi celicami z gostim jedrom (DC) in večjimi retikularnimi celicami (RC) (Carlyon in Troese, 2008). DC so prilagojene za vezavo na tarčne celice in/ali preživetje zunaj celic, medtem ko so RC pomembne za razmnoževanje znotraj celic. RC so neinfektivna oblika, ki dozorijo v DC in se sprostijo iz celic z lizo. Te nato vstopijo v tarčne celice z endocitozo s kaveolami. Kaveole so različno oblikovane invaginacije celične membrane, ki opravlja funkcijo endocitnega ali eksocitnega prenosa (Lin in Rikihisa, 2003). Ker gre za sistem prenosa znotraj celice, ki se izogne fagolizosomalnim potem, ga izkoriščajo mnoge intracelularne bakterije (Norkin in sod., 2001; Shin in Abraham, 2001; Duncan in sod., 2002; Jutras in sod., 2003). Za razliko od drugih bakterij, ki izkoriščajo kaveole samo za vstop v celico, pa *A. phagocytophilum* ostane povezana z njimi skozi celotno intralevkocitno fazo (Lin in Rikihisa, 2003). Na ta način lahko preživi znotraj celice, ki je po primarni funkciji fagocit, saj se kaveosomi ne združujejo z lisozomi (Lin in Rikihisa, 2003).

Drug pomemben način preživetja znotraj nevtrofilca je izguba genov za lipopolisaharid (LPS) in peptidoglikan, molekulskih motivov na celični steni patogenih mikroorganizmov, ki ob vezavi z nevtrofilci sprožijo močan naravni imunski odgovor. Izguba LPS in peptidoglikana je pripomogla k prilagoditvi bakterije *A. phagocytophilum* na preživetje znotraj nevtrofilcev in klopoval, hkrati pa je zmanjšala trdnost njene membrane. Zato je *A. phagocytophilum* razvila sposobnost prevzema holesterola iz gostiteljeve celice. Izguba peptidoglikana ima za bakterijo *A. phagocytophilum* tudi druge ugodnosti, kot so lažje vstopanje v majhen intravakuolarni prostor, kar dodatno poveča kompatibilnost z nevtrofilci in klopi (Lin in Rikihisa, 2003; Rikihisa, 2006).

Znotraj fagosoma *A. phagocytophilum* inhibira nastanek reaktivnih kisikovih presnovkov, s tem da prepreči sintezo podenot NADPH oksidaze, ki katalizira reakcijo redukcije molekulskega kisika v superoksidni anion (O_2^-). Pred poškodbo s kisikovimi radikali naj bi se

zaščitila tudi s superoksidno dismutazo (SOD), encimom, ki detoksificira O_2^- (Carlyon in Fikrig, 2003; Allen, 2003).

Po vstopu *A. phagocytophilum* spodbuja izločanje kemokinov iz okuženih nevtrofilcev, predvsem interlevkina 8 (IL-8), kar poveča dotok neokuženih nevtrofilcev in s tem možnost za nadaljne razmnoževanje. *A. phagocytophilum* poveča izražanje antiapoptotičnega gena, preprečuje nevtrofilcem, da bi izgubili membranski potencial mitohondrijev ter blokira z anti-Fas povzročeno programirano celično smrt nevtrofilcev. S tem se podaljša življenska doba okuženih celic, kar daje bakteriji dovolj časa (> 24 ur po okužbi), da razvije morule (Rikihisa, 2006; Lee in Goodman, 2006).

2.4.3 Odgovor gostitelja na okužbo z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum*

Imunski odgovor na okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum* še ni docela pojasnjen. Na začetku okužbe veliko vlogo odigra IFN- γ , ki ga proizvajajo NK celice, ne limfociti Th1 (Birkner in sod., 2008). IFN- γ pa doprinese tudi k histopatološkim spremembam. To so dokazali z mišmi z izbitim genom za IFN- γ , ki so po okužbi pokazale sicer višje število patogena, vendar brez histopatoloških lezij (Dumler, 2012). Raziskave na miših so tudi pokazale, da je za dokončno eliminacijo bakterij potreben odgovor s CD4+ limfociti T in ni odvisen od glavnih Th1 citokinov, kot sta IL-12 in IFN- γ (Birkner in sod., 2008).

Prav tako eliminacija bakterije *A. phagocytophilum* ni odvisna od CD8+ limfocitov T ali limfocitov B. Vendar so miši brez B-celične linije pokazale povišano število bakterij, zato se predvideva, da so limfociti B vpletjeni v zgodnjo kontrolo okužbe. SCID miši, pri katerih so odvzeli tako B- kot T-celično linijo, so poginile za posledicami okužbe z bakterijo *A. phagocytophilum*, medtem ko miši, ki so jim odvzeli zgolj T-celično linijo, niso poginile (Birkner in sod., 2008). To nakazuje na možnost regulacijskih nalog limfocitov B, ki pa niso pomembne za dokončno odstranitev bakterije *A. phagocytophilum*.

Psi lahko ostanejo perzistentno okuženi (Egenvall in sod., 2000), vendar mehanizem še ni natančno poznan. Granquist in sodelavci (2010) so pri ovcah raziskovali pomen antigenske variacije gena za *msp2(p44)*, ki kodira protein na zunanjih membrani, pomemben pri imunski prepoznavi. Mehanizem variacije najverjetneje temelji na vstavitvi delne ali popolne sekvene donorjevega psevdogena na mestu ekspresije. Imunski odgovor na *msp2(p44)* je usmerjen tako proti ohranjenim kot tudi hipervariabilnim segmentom molekule. Odgovor je

najmočnejši na začetku in pojenjuje skozi trajanje perzistentne okužbe, kar najverjetneje omogoča preživetje bakterije *A. phagocytophilum* znotraj gostitelja (Granquist in sod., 2010).

2.5 Klinična slika

Večina psov po naravni okužbi z bakterijo *A. phagocytophilum* najverjetneje ostane zdravih, kar nakazuje visoka seroprevalenca pri psih na endemičnih področjih brez kliničnih znakov (Beall in sod., 2008; Foley in sod., 2001). Inkubacijska doba pri naravni okužbi traja od 4–14 dni, odvisno od imunskega statusa gostitelja in virulence povzročitelja. Najpogostejša klinična znaka sta letargija in povišana telesna temperatura (Greig in sod., 1996; Kohn in sod., 2008; Egenvall in sod., 1997; Björsdorff, 2005). V treh izmed štirih raziskavah so letargijo ugotovili skoraj pri vseh psih, povišano telesno temperaturo pa pri približno 90 % psov (Greig in sod., 1996; Poitout in sod., 2005; Egenvall in sod., 1997). Povišana telesna temperatura nad 39,0 °C običajno vztraja dva do pet dni (Lilliehöök in sod., 1998). Inapetenca ali anoreksija je opisana pri 47–88 % psov. Zelo pogosto bolezen spremišča šepanje oziroma oteženo gibanje. Lahko se pojavi kašelj, ki je običajno neproduktiven. Njegov nastanek je povezan z infiltracijami v intersticiju pljuč in fokalnimi alveolarnimi spremembami (Plier in sod., 2009). Manj pogosto se pojavijo polidipsija, blede sluznice, gastrointestinalni znaki, kot so bruhanje in driska, ter krvavitve, ki se kažejo kot petehije, melena ali epistaksa (Greig in sod., 1996; Poitout in sod., 2005; Kohn in sod., 2008). S kliničnim pregledom, ultrazvokom ali rentgenom lahko zaznamo tudi limfadenopatijo in splenomegalijo, ki sta posledici reaktivne limfoidne hiperplazije in ekstramedularne hematopoeze (Egenvall in sod., 1998; Hodzic in sod., 1998). Lahko se pojavijo znaki motenj v centralno - živčnem sistemu, kot so napadi ali motnje v propriocepiji (Björsdorff, 2005). Nevrološki znaki so opisani pri dveh od 17-ih obolelih psov iz ZDA, vendar je imel eden izmed njiju zgodovino idiopatske epilepsije (Greig in sod., 1996). Povezava med nevrološkimi znaki in anaplasmozo ni bila ugotovljena v študiji 248 psov s prizadetostjo živčnega sistema (Jäderlund in sod., 2007). Pri psu z meningitisom so v Kaliforniji s citološko preiskavo našli granulocitno morulo v cerebrospinalni tekočini (Maretzki in sod., 1994).

2.6 Laboratorijske spremembe

Različne erlihije okužujejo različne krvne celice, vendar so pri vseh hematološke spremembe precej podobne. To nakazuje na verjetnost, da patogeneza pancitopenije ni povezana z okužbo določenih tarčnih celic, ampak najverjetneje z različnimi citokini, ki jih izločajo okužene celice (Lepidi in sod., 2000; Lilliehöök in sod., 1998).

Najpogosteja odstopanja hematoloških parametrov so anemija (blaga do huda stopnja), levkopenija z limfo- in nevtropenijsko, ki ji sledi levkocitoza z limfocitozo, ter trombocitopenija (blaga do huda stopnja) (Tozon in Petrovec, 2002; Lilliehöök in sod., 1998). Trombocitopenija se pojavi pri približno 90 % psov (Greig in sod., 1996). Najbolj izrazita je v fazi bakteriemije. V nekaj dneh po bakteriemiji se število trombocitov normalizira (Lilliehöök in sod., 1998; Björsdorff, 2005). Večina psov ima povišano število skupnih in mladih megakariocitov v kostnem mozgu. V krvi so prisotni veliki trombociti, MPV in PDW sta povišana, kar nakazuje na aktivno trombopoezo (Lilliehöök in sod., 1998). Pri okužbi z bakterijo *E. canis* limfociti izločajo faktor, ki inhibira migracijo trombocitov, kar povzroči pomembne spremembe na njihovi površini (Abeygunawardena in sod., 1990). Nadalje se po okužbi pojavijo protitelesa proti trombocitom (Harrus in sod., 1996). Tako najverjetneje različni imunski mehanizmi povzročijo trombocitopenijo pri erlihiozi, verjetno pa tudi pri anaplazmozi. Blago, neregenerativno anemijo so zabeležili pri petih od 23-ih psov iz ZDA (Greig in sod., 1996). Pri 11-ih od 18-ih psov iz Nemčije poročajo o srednji do blagi stopnji anemije, ki je regenerativna v 37,5 % primerov (Kohn in sod., 2008). V raziskavi na Švedskem so vsi psi, eksperimentalno okuženi z bakterijo *A. phagocytophilum*, razvili blago normocitno, normokromno anemijo. Eritroidne spremembe so bile podobne anemiji vnetne bolezni (Lilliehöök in sod., 1998). Pri tem pride do zmanjšane eritropoeze zaradi citokinov, npr. IL-1, IFN- γ in TNF- α , ki inhibirajo aktivatorje kostnega mozga, kot sta eritropoetin in CFU eritroid. Ostali mehanizmi so še funkcionalno pomanjkanje železa kljub zadostnim retikuloendotelnim zalogam in skrajšana življenska doba eritrocitov (Walter in sod., 1997). Nevtropenijska z limfopenijo je blaga in kratkotrajna. Pojavi se mieloidna hiperplazija kostnega mozga, vendar brez prisotnosti nezrelih oblik nevtrofilcev v krvi, kar nakazuje na okrnjeno mielopoezo (Lilliehöök in sod., 1998). Druga poročila navajajo nevtrofilijo ali nevtropenijsko; največ okuženih psov ima nevtrofilce v spodnji polovici referenčnega intervala (Greig in sod., 1996; Poitout in sod., 2005; Egenval in sod., 1997). Eozinopenija je bila prisotna pri vseh psih v raziskavi na Švedskem (Lilliehöök in sod., 1998). Eozinopenija je pogosta pri

infekcijskih boleznih (Bass in sod., 1980). O monocitopeniji poročajo pri približno tretjini okuženih psov iz ZDA (Greig in sod., 1996; Poitout in sod., 2005), medtem ko je imela večina psov iz Nemčije monocitozo (Kohn in sod., 2008).

A. phagocytophilum lahko okuži tudi nezrele celice kostnega mozga, vendar to najverjetneje neposredno ne vpliva na spremembe hematoloških parametrov. Glavni mehanizem razvoja pancitopenije je verjetno posledica hemofagocitoze okuženih levkocitov v vranici, bezgavkah in pljučih ter periferne sekvestracije, porabe in destrukcije krvnih celic, saj pri večini okuženih živali s pancitopenijo ostaja celularnost kostnega mozga normalna ali celo difuzno hiperplastična (Lepidi in sod., 2000).

Dosedanje klinične študije kažejo, da pri anaplazmozi v večini primerov ne pride do bistvenih odstopanj biokemijskih dejavnikov v krvnem serumu, razen običajno blagega zvišanja aktivnosti jetrnih encimov alkalne fosfataze in alanin aminotransferaze (Björsdorff, 2005). V nekaterih raziskavah poročajo še o blagi hipoalbuminemiji in hiperglobulinemiji (Greig in sod., 1996; Poitout in sod., 2005; Gravino in sod., 1997; Egenvall in sod., 1997).

2.7 Imunsko pogojene bolezni kot posledica okužbe z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum*

Številne infekcijske bolezni privedejo do avtoimunih reakcij v času okužbe ali po njej. V veterinarski medicini je izraz avtoimuna bolezen omejen na bolezen, pri kateri ne moremo identificirati vzroka, nimamo dokaza o okužbi, kadar avtoprotitelesa ali avtoreaktivni limfociti povzročajo poškodbo tkiv in kadar se bolezen odzove na imunosupresivno terapijo (Day, 2003). Vendar se pojavlja vse več dokazov, da je veliko teh bolezni povezanih s predhodno okužbo, ki je v času avtoimunega obolenja ne moremo identificirati, ker jo je žival že prebolela ali pa je v latentni fazi. Nastanek teh bolezni je pogojen z različnimi imunološkimi mehanizmi. Okužba z različnimi mikroorganizmi lahko privede do nastanka imunskih kompleksov, ki so sestavljeni iz antiga, protitelesa in komplementa, in krožijo po krvi ter se odlagajo v kapilarinem mrežju očesa, kože, sklepov, glomerulusa ali možganov. Klinično tako prepoznamo imunsko pogojeni glomerulonefritits (IMGN), uveitis in poliartritis (Day, 1999). Nadalje lahko okužba privede do nastanka protiteles, ki reagirajo z lastnim tkivom – po definiciji so to prava avtoprotitelesa – vendar običajno nastanejo med samo okužbo. S klopi prenosljive bolezni so še posebej dober primer avtoimunosti, nastale po

okužbi z mikroorganizmi. Pri monocitni erlihiozi pride do nastanka kompleksnih multisistemskih kliničnih znakov, ki so posledica prekomerne aktivnosti limfocitov B, kar vodi do nastanka poliklonalne hipergamaglobulinemije, tvorbe CIC-ov in s tem IMGN, uveitisa in poliartritisa. Perzistenti artritis pri boreliozi je pri nekaterih humanih pacientih posledica avtoimunosti limfocitov T, ki je uperjena proti hLFA-1 (human leucocyte function-associated antigen -1), ki ima homologne epitope imunodominatnim epitopom OspA *B. burgdorferi s.l.* (Gross in sod., 1998).

Poročila o avtoimunih boleznih kot posledica okužbe z bakterijo *A. phagocytophilum* so redka. V primeru okužb z rikecijami iz družine *Anaplasmataceae* so poročila večinoma vezana na okužbo z bakterijo *E. canis*, kjer pride do pojava IMGN, uveitisa, poliartritisa, imunsko pogojene anemije (IHA) in trombocitopenije (IMT) (Harrus in sod., 2001; Day, 2008; Vaden in Grauer, 2011). IMGN pri erlihiozi nastane kot posledica odlaganja CIC-ov v glomerulu, kar privede do aktivacije komplementa in izzove preobčutljivostno reakcijo tipa III (Day, 2008). Primarni glomerulitis se nadaljuje v poškodbo tubulov in nadalje v izgubo nefronov z intersticijsko fibrozo in glomerulosklerozo. Histološke spremembe so odvisne od mesta odlaganja CIC-ov; lahko je prisotnih tudi več glomerularnih lezij naenkrat. Na podlagi histoloških sprememb ločimo difuzni membranozni GN, membranoproliferativni GN in mesangioproliferativni GN (Day, 2008). IMGN pri erlihiozi običajno opisujejo kot nespecifičen GN (Vaden in Grauer, 2011). V študiji, ki je vključevala 30 psov z erlihiozo, kjer so pri 12-ih od 18-ih zaznali proteinurijo, so pri dveh od treh post mortem dokazali membranozni GN (Troy in sod., 1980). Klinični znaki so odvisni od stopnje poškodb glomerulov. Lahko so najizrazitejši znaki primarne bolezni, največkrat pa pri kroničnih ali perzistentnih okužbah zaznamo znake sekundarnega IMGN, kot je nefrotski sindrom ali odpoved ledvic (Pedersen, 1999). Uveitis je najpogostejša sprememba na očeh pri erlihiozi – v študiji, ki je vključevala 90 psov, je bil uveitis prisoten v 100 % primerov (Komnenou in sod., 2007). Z eksperimentalno študijo so prav tako histopatološko dokazali prisotnost anteriornega ali posteriornega uveitisa pri 100 % psov z aktivno erlihiozo (Swanson in Dubielzig, 1986; Panciera in sod., 2001). Patogeneza uveitisa je slabo raziskana, vendar se kot najverjetnejši vzrok omenjajo imunsko pogojeni mehanizmi, predvsem imunske reakcije tipa III, ki privedejo do vaskulitisa in posledično uveitisa (Komnenou in sod., 2007). Poliartritis pri erlihiozi je največkrat neerozivni imunsko pogojeni poliartritis tipa II (Day, 2008), ki je tudi posledica imunske reakcije tipa III. V redkih primerih so v sinovialni tekočini dokazali

prisotnost morul in s tem poliartritis, povzročen neposredno z okužbo (Taylor, 2003). Pojav trombocitopenije pri erlihiozi prav tako pripisujejo imunopatološkim mehanizmom. Pri eksperimentalno okuženih psih so dokazali pojav serumskih IgG proti trombocitom 17. dan po okužbi, v času izrazite trombocitopenije (Waner in sod., 1995). Začetno znižanje trombocitov se sicer pojavi že zelo zgodaj po okužbi, kar pripisujejo prezgodnjemu pojavu protiteles proti trombocitom, ki privede do fagocitoze z antigeni prekritih trombocitov v vranici in jetrih. Okužba z bakterijo *E. canis* naj bi privedla do spremembe v imunskejem sistemu gostitelja, kar vodi v hiperprodukcijsko visoko afinitetnih protiteles proti trombocitom (Harrus in sod., 1996). Opisani mehanizem naj bi bil glavni vzrok za nastanek trombocitopenije pri erlihiozi, čeprav je najverjetneje vpletenih še več neimunoloških mehanizmov (Waner in sod., 1999).

2.8 Ugotavljanje okužbe

Na anaplazmozo moramo posumiti pri vseh pacientih z akutnim infekcijskim sindromom, ki prihajajo z endemičnih področij, še posebej v času povečane aktivnosti klopovalcev. Nadalje je smiselno testiranje pacientov s kroničnim šepanjem, GN in uveitisom, pri katerih ne najdemo drugega očitnega vzroka. Obolenje lahko potrdimo, kadar so izpolnjeni spodaj opisani klinični in laboratorijski kriteriji.

Pomembni anamnestični podatki za postavitev suma na anaplazmozo so ugriz klopa in gibanje živali na endemičnem področju.

Kriteriji za definicijo akutne anaplazmoze psov in mačk (prilagojeno po priporočilih Centra za nadzor in preventivo bolezni Atlanta, ZDA, 2000) (Björsdorff, 2005)

Klinični kriteriji

Anaplazmoza običajno poteka kot vročinsko stanje ozioroma akutni infekcijski sindrom. Laboratorijska odstopanja so lahko: prisotnost morul v nevtrofilcih v razmazu periferne krvi, citopenija (predvsem trombocitopenija in levkopenija) in povečana aktivnost jetrnih encimov.

Laboratorijski kriteriji za potrditev diagnoze

- najmanj štirikratno povečanje titra specifičnih protiteles od mejnega titra z metodo IFA v parnih serumskih vzorcih v presledku vsaj štirih tednov **ali**
- dokaz DNA bakterije *A. phagocytophilum* s PCR **ali**
- identifikacija morul v levkocitih v krvi, kostnem mozgu ali cerebrospinalni tekočini in pozitiven IFA titer (na osnovi mejnega titra, ki ga določa laboratorij) **ali**
- osamitev bakterije *A. phagocytophilum* v kulturi iz kliničnega vzorca bolne živali.

Potrditev kliničnega primera:

- **najverjetnejše:** klinični znaki, ki ustrezajo opisanim ob pozitivnem IFA titru (na osnovi mejnega titra, ki ga določa laboratorij) ali prisotnost morul v levkocitih
- **potrditev:** klinični znaki, ki ustrezajo opisanim, in jih lahko potrdimo tudi laboratorijsko.

2.8.1 Ugotavljanje povzročitelja

2.8.1.1 Pregled krvnega razmaza

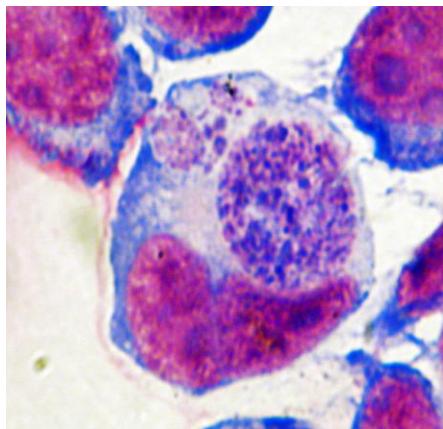
V obdobju bakteriemije lahko v krvnem razmazu, barvanem po Romanovskem ali Giemsi, v nevtrofilcih ugotovimo morule (Slika 2). Morule se običajno obarvajo neenakomerno temno modro in so praviloma temnejše od celičnega jedra. Ker se pojavljajo le kratek čas v obdobju bakteriemije in so relativno redke, negativen krvni razmaz ne izključuje okužbe z bakterijo *A. phagocytophilum* (Björsdorff, 2005). V štirih večjih študijah so morule ugotovili pri 36, 56, 67 in 100 % psov s stopnjo pojavnosti okuženih nevtrofilcev od 7 do 32 % (Greig in sod., 1996; Poitout in sod., 2005; Kohn in sod., 2008; Egenvall in sod., 1997). Pri eksperimentalno okuženih psih so dokazali pojav morul četrti dan po inokulaciji; vztrajale so štiri do osem dni (Egenvall in sod., 1998). Z mikroskopskim pregledom ne moremo ločiti med morulami bakterij *A. phagocytophilum* in *Ehrlichiae* spp, predvsem bakterije *E. ewingii*, zato je nujna potrditev povzročitelja s PCR (Carrade in sod., 2009).



Slika 2: Morula v granulocitu; *fotografija dr. N. Pusterla*

2.8.1.2 Osamitev

Bakterijo *A. phagocytophilum* je pod določenimi pogoji možno osamiti in razmnožiti *in vitro* v celicah HL-60 ali kloplni embrionalni celični liniji. Morule v celični kulturi prikazuje Slika 3. Čeprav je osamitev najbolj občutljiva diagnostična metoda za ugotavljanje akutne okužbe pri ljudeh (Aguero, 2002), se ne uporablja rutinsko (Carrade in sod., 2009).



Slika 3: Morula v celici celične kulture; *fotografija dr.M. Petrovec*

2.8.1.3 Molekularne metode ugotavljanja bakterije *Anaplasma phagocytophilum*

Za detekcijo DNA bakterije *A. phagocytophilum* v periferni krvi, kostnem mozgu, sinovialni in cerebrospinalni tekočini ali tkivnih vzorcih je bilo razvitih več konvencionalnih in PCR metod v realnem času. Tarčne gene v večini metod predstavlja gen za 16S rRNA ali gen za

zunanji površinski protein *msp2*(p44) (Carrade in sod., 2009). Metode za gen *msp2* so običajno specifične za bakterijo *A. phagocytophilum*, medtem ko metode za gen 16S rRNA lahko zaznajo tudi druge anaplaume in celo druge bakterije, kot je *Bartonella henselae* (Egenvall in sod., 2000), zato je v teh primerih sekveniranje dobljenih produktov nujno. Ostale metode kot tarčne gene uporabljajo še *msp4*, *groEL*, *rrs*, *epank1* ali *ank A* (Massung in Slater, 2003; de la Fuente in sod., 2008; Santos in sod., 2004; Walls in sod., 2000). Še vedno ni znan optimalen čas odvzema vzorca, pri katerem je občutljivost metode največja (Chapman in sod., 2006). Pri eksperimentalno okuženih psih so povzročitelja s PCR dokazali šest do osem dni pred in tri dni po tem, ko so se pojavile morule v krvi (Egenvall in sod., 1998; Egenvall in sod., 2000).

2.8.2 Ugotavljanje specifičnih protiteles proti bakteriji *Anaplasma phagocytophilum*

Specifična IgG in IgM protitelesa proti bakteriji *A. phagocytophilum* lahko ugotavljamo z različnimi metodami, kot so IFA, imunoblot ali encimsko imunski test (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA) (Björsdorff, 2005).

Prva protitelesa v serumu lahko dokažemo približno osem dni po okužbi, dva do pet dni po pojavu morul. Z razvojem bolezni pa se serološki odgovor povečuje, zato se povečuje tudi občutljivost IFA metode, ki je največja (94–100 %) 14 dni po eksperimentalni okužbi (Chapman in sod., 2006). Ker je pozitiven titer protiteles lahko odraz pretekle izpostavitve povzročitelju, je potreben dokaz štirikratnega povišanja mejnega titra. Protitelesa v serumu namreč lahko vztrajajo več mesecov po okužbi (Egenvall in sod., 1997; Egenvall in sod., 2000). Rezultati ene študije dokazujo prisotnost protiteles pri psih še 12 mesecov po akutni okužbi (Poitout in sod., 2005), pri ljudeh celo tri leta po okužbi (Bakken in Dumler, 2008). V klinični praksi velja, da štirikratno povečanje mejnega titra z IFA ob prisotnih kliničnih znakih pomeni pozitiven rezultat in potrditev bolezni (Björsdorff, 2005).

Pri serološki diagnostiki se moramo zavedati možnosti navzkrižne reaktivnosti med antigeni in protitelesi proti različnim rikecijskim povzročiteljem iz rodov *Anaplasma* in *Ehrlichia* (Harrus in Waner, 2005; Chapman in sod., 2006). Z uporabo monoklonalnih protiteles proti visoko ohranjenemu proteinu 5 (*msp5*) so z indirektno ELISA metodo dokazali 100-odstotno serološko navzkrižno reaktivnost med bakterijama *A. phagocytophilum* in *A. marginale* (Strik in sod., 2007). Prav tako obstaja serološka navzkrižna reaktivnost med bakterijama *A. phagocytophilum* in *A. platys*, tudi pri široko uporabljeni metodi z rekombinantnim *msp2*

(Bowman in sod., 2009). Poročajo tudi o navzkrižni reaktivnosti med bakterijama *A. phagocytophilum* in *E. canis*, ki pa je manj pogosta (Poitout in sod., 2005; Plier in sod., 2009; Breitschwerdt in sod., 1998), verjetno zato, ker do produkcije specifičnih IgG proti bakteriji *A. phagocytophilum* pride šele določen čas po okužbi z bakterijo *E. canis* (Waner in sod., 1998).

Na tržišču so prisotni hitri testi za serološko diagnostiko anaplazmoze, ki protitelesa dokazujejo s postopkom ELISE. Za edinega, ki se uporablja pri nas (SNAP® 4Dx® Test Kit IDEXX Laboratories), proizvajalec navaja 99,1-odstotno občutljivost in 100-odstotno specifičnost. Gre za imunosorbentni test, ki uporablja sintetični peptid iz proteina na zunanjih membrani (p44) za detekcijo specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum*. Serokonverzijo Snap 4Dx test zazna kasneje kot IFA, in sicer 17–30 dni, IFA pa 10–15 dni po okužbi (Scorpio in sod., 2011). Zavedati se moramo omejitve hitrih testov, saj nam podajo zgolj kvalitativen odgovor o prisotnosti specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum*. Zato zgolj pozitiven hitri test ne sme biti razlog za zdravljenje. Najprimernejši serološki test je test z metodo IFA, ker nam omogoča spremeljanje višine in porasta titra specifičnih protiteles, kar nam skupaj z laboratorijskimi in kliničnimi odstopanjimi pomaga pri odločitvi glede zdravljenja.

2.9 Zdravljenje in preprečevanje bolezni

In vitro je *A. phagocytophilum* dovetna za številne antibiotike, ki prehajajo celično membrano in aktivno delujejo znotrajcelično. Mednje sodijo tetraciklini, rifampicin, rifabutin in trovafloksacin. Rezistentna je na gentamicin, eritromicin, azitromicin, klindamicin in trimetoprim – sulfametoksazol in na vse antibiotike, ki ne prehajajo celične membrane, vključno z β-laktamskimi antibiotiki. *In vivo* so najučinkovitejši tetraciklini, delno sta bila učinkovita tudi rifampicin in kloramfenikol. Zdravilo izbora za zdravljenje anaplazmoze pri psih in mačkah je doksiciklin. Čeprav optimalna doza in trajanje zdravljenja še niso dokončno določeni, se priporoča zdravljenje v odmerku 5–10 mg/kg TT/12–24 ur 30 dni (Greig in Armstrong, 2006; Breitschwerdt in sod., 1998). V večini primerov klinični znaki izzvenijo v 24–48 urah in prognoza za klinično ozdravitev je dobra (Greig in Armstrong, 2006). Vendar so pri eksperimentalno okuženih psih, zdravljenih z doksiciklinom v priporočenih dozah 14 in 28 dni, dokazali pojav perzistentnih in subkliničnih okužb (Alleman in sod., 2006; Alleman in

sod., 2007). Čeprav je namreč klinično izboljšanje običajno doseženo, je nemogoče zagotoviti učinkovitost terapije v popolni eliminaciji bakterije *A. phagocytophilum* iz naravnega okuženega gostitelja. Če žival ne proizvaja več specifičnih protiteles, je to indikacija, da je bila *A. phagocytophilum* eliminirana iz organizma. Ker pa protitelesa lahko vztrajajo več mesecev, ni smiseln podaljševati zdravljenja po izboljšanju kliničnih znakov za nadaljnjih 30 dni ali menjati antimikrobne učinkovine v želji doseči seronegativen rezultat (Alleman in sod., 2007). Ker je uporaba tetraciklinov pri mladih živalih lahko povezana s hipoplazijo sklenine, je bil kot alternativa predlagan kloramfenikol (15–25 mg/kg TT/8 ur 14–21 dni) za pse, mlajše od enega leta (Greig in Armstrong, 2006). Vendar dokazi kažejo, da doksiciklin v nasprotju s tetraciklini ne povzroča hipoplazije sklenine pri rastočih psih. Zaradi resnosti obolenja, kot je anaplastoma, se priporoča zdravljenje z doksiciklinom ne glede na starost psa. Doksiciklin sicer lahko izzove slabost in bruhanje, čemur se izognemo z dajanjem zdravila v več dnevnih odmerkih in skupaj s hrano, kar ne zmanjša resorbkcije same učinkovine (Björsdorff, 2005).

2.9.1 Serološko pozitivni asimptomatski psi

Psi iz endemičnih področij so pogosto izpostavljeni okužbi z bakterijo *A. phagocytophilum* - seroprevalenca v ZDA in Evropi je 55- oziroma 50-odstotna (Beall in sod., 2008; Barutzki in sod., 2006). Glede na dokaze o perzistentni okužbi pri klinično zdravih psih (Egenvall in sod., 2000; Alleman in sod., 2006; Alleman in sod., 2007) je verjetno del seropozitivnih psov kroničnih prenašalcev. Incidenca kronično okuženih psov, ki kasneje zbolijo, ni natančno znana. Ciklični pojav kliničnih primerov anaplastome, ki nastopi v sezoni povečane aktivnosti klopovalcev, govori za to, da je anaplastoma akutno obolenje, ki nastopi nekaj dni po inokulaciji bakterije *A. phagocytophilum* (Egenvall in sod., 1998; Greig in Armstrong, 2006). Ker kronična okužba ni neposredno povezana z nastopom klinične bolezni in je učinkovitost doksiciklina v popolni odstranitvi povzročitelja nepopolna, se zdravljenje serološko pozitivnih, klinično zdravih psov odsvetuje. Kljub vsemu serološko pozitivnega rezultata ne smemo zanemariti. Pri takem pacientu je smiseln spremljati morebitna klinična odstopanja, pojav proteinurije in drugih laboratorijskih odstopanj, kot je ponovna trombocitopenija. Prav tako moramo lastniku svetovati dosledno uporabo akaricidnih sredstev, da zmanjšamo možnost sočasne okužbe z drugimi s klopi prenosljivimi povzročitelji, saj je znano, da sočasne okužbe z bakterijo *B. burgdorferi s.l.* povečajo možnost za pojav klinične bolezni. Nadalje obstaja možnost, da pri kronično okuženih psih pride do pojava kliničnih znakov ob

uporabi zdravil ali sočasni drugi bolezni, ki spremeni imunski odgovor. Aplikacija imunosupresivnih doz kortikosteroidov kronično okuženim, asimptomatskim psom je povzročila bakteriemijo, čeprav so psi ostali asimptomatski (Egenvall in sod., 2000; Alleman in sod., 2006; Alleman in sod., 2007).

2.9.2 Preprečevanje bolezni

Zaščitnega cepiva ni. Najzanesljivejša preventiva je izogibanje endemičnim področjem, pozorni pregledi in odstranjevanje klopoval s kožuha po sprehodu ter preventivna uporaba akaricidnih pripravkov s podaljšano učinkovitostjo in repellentnim učinkom (Björsdorff, 2005).

2.10 Anaplastoma pri ljudeh

Humana granulocitna anaplastoma je nespecifična vročinska bolezen. Pogosto jo opisujejo kot 'gripi podobno obolenje po ugrizu klopa' (Bakken in sod., 1996). Moški obolijo nekoliko pogosteje kot ženske (Dumler in sod., 2007). Približno 75 % ljudi v anamnezi navede ugriz klopa (Bakken in Dumler, 2008). Tudi pri ljudeh je možna sočasna okužba z bakterijo *B. burgdorferi s.l.* Seroprevalenca pri ljudeh, ki navajajo ugriz klopa, v ZDA je 8,9–36 % (Bakken in Dumler, 2008). V Evropi o okužbi pri ljudeh najpogosteje poročajo iz Slovenije in Švedske (Strle, 2004; Petrovec in sod., 1997). Najpogostejši klinični znaki so vročina, mrzlica, glavobol, bolečine v mišicah in sklepih (Lotrič-Furlan in sod., 2006) pa tudi slabost, anoreksija in kašelj (Bakken in Dumler, 2008; Bakken in sod., 1996; Dumler in sod., 2007). Približno 10 % bolnikov ima lahko hude zaplete. Smrt nastopi v $\leq 1\%$ primerov kot posledica teh zapletov (Bakken in Dumler, 2008). Resnejše obolenje običajno nastopi pri starejših in pri ljudeh s sočasnim imunosupresivnim obolenjem ali imunosupresivno terapijo. Laboratorijsko zaznamo zmerno levkopenijo in trombocitopenijo ter povišano aktivnost jetrnih encimov in povečano koncentracijo C-reaktivnega proteina (Bakken in Dumler, 2008; Bakken in sod., 1996; Dumler in sod., 2007; Brouqui in sod., 2004).

Pojav bolezni pri psih nakazuje na povečano možnost pojava bolezni pri ljudeh. Psi lahko povečajo možnost kontakta med okuženim klopom in ljudmi, vendar raziskave kažejo, da med ljudmi, ki so izpostavljeni kontaktu s psi, in tistimi, ki takega kontakta nimajo, ni razlike v prevalenci specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum* (Skerget in sod., 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Zasnova študije

3.1.1 Retrospektivna študija

V retrospektivnem delu smo proučili klinične podatke 754 psov, ki so bili na Kliniki za kirurgijo in male živali (KKMŽ) med letoma 1999 in 2011 laboratorijsko testirani na prisotnost specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum* in na prisotnost samega povzročitelja. V nadaljnjo raziskavo smo od testiranih vključili 553 psov, pri katerih je bila dokazana prisotnost specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum* in/ali prisotnost povzročitelja. Osredotočili smo se na pasmo, starost, spol ter morebitno sočasno okužbo z bakterijo *B. burgdorferi s. l.*. Pri 149-ih psih smo poleg omenjenih preverili še klinične in laboratorijske spremembe v času ugotovitve anaplazmoze.

3.1.2 Prospektivna študija

Drugi del naloge, kjer smo proučevali imunski odziv z ugotavljanjem CIC-ov, hiperglobulinemije in proteinurije, smo izvedli na populaciji 34-ih delovnih psov in 204-ih naključnih pacientov, ki smo jih na Kliniki za kirurgijo in male živali (KKMŽ) zaradi suma na anaplazmozo testirali na prisotnost specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum* in samega povzročitelja.

V tem delu smo podrobnejše ovrednotili število trombocitov in statistično značilne razlike v pojavljanju trombocitopenije med skupinami, in sicer smo v ta namen zbrali 204 vzorce psov, vključenih v prospektivno študijo, in 97 vzorcev psov iz retrospektivne študije, skupaj torej 301 vzorec polne krvi.

Sekveniranje smo izvedli na 98 PCR pozitivnih vzorcih, od katerih je bilo 24 vzorcev od pacientov KKMŽ in so bili vključeni v nadaljevanje prospektivne študije, 74 vzorcev pa od pacientov iz drugih veterinarskih klinik v Sloveniji, ki niso bili vključeni v nadaljevanje prospektivne študije.

3.2 Živali

V obeh delih naloge živali predstavljajo naključni pacienti KKMŽ. V študijo smo vključili pse na podlagi pozitivnega IFA titra ali PCR rezultata za bakterijo *A. phagocytophilum* z ali

brez značilnih kliničnih in laboratorijskih odstopanj, ki po zdajšnjih kriterijih veljajo za dokaz aktivne anaplazmoze (Bjöersdorf, 2005). V drugi del je vključena tudi skupina delovnih psov Slovenske vojske.

Živali smo razdelili v osem skupin, in sicer v šest skupin serološko pozitivne v različnih titrih, v eno skupino PCR pozitivne, v kontrolno skupino pa serološko ter PCR negativne živali. Pse znotraj posameznih skupin smo primerjali s kontrolno skupino in med sabo glede na izraženost bolezenskih znakov v prizadetem organskem sistemu, hematološka odstopanja, hiperglobulinemijo, prisotnost CIC-ov ter prisotnost in vrsto proteinurije.

3.3 *Odvzem in priprava vzorcev*

Vzorec venozne krvi, odvzet s punkcijo ene od perifernih ven (*vene cephalicae antebrachii, vene saphenae ali vene jugularis*), smo razdelili na več delov: za hematološke preiskave in ugotavljanje povzročitelja z metodo PCR smo vzorce shranili v epruvete z antikoagulantom (EDTA) (MicrotainerTM, Beckton and Dickinson, Franklin Lakes, USA), kri za serum, v katerem smo ugotavljali prisotnost specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum* in različne frakcije proteinov, pa smo shranili v epruvete s podtlakom brez antikoagulanta (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria). Serum je bil pridobljen tako, da smo kri po 30 minutah centrifugirali 10 minut pri 1200 obratih in temperaturi 4 °C.

Vzorce urina smo odvzeli s kateterizacijo v sterilne plastične epruvete. Za pregled sedimenta smo urin centrifugirali pri 800 obratih 10 minut.

Za preiskave, ki smo jih izvajali serijsko, smo vzorce seruma in urinskega supernatanta shranili z zamrzovanjem pri –20 °C.

3.4 *Ugotavljanje okužbe*

V serumu preiskovanih živali smo ugotavljali specifična protitelesa IgG proti bakteriji *A. phagocytophilum* z indirektnim imunofluorescenčnim testom.

Za detekcijo DNA bakterije *A. phagocytophilum* v polni krvi smo uporabili metodo PCR.

3.4.1 Indirektni imunofluorescenčni test

IFA smo izvedli po že opisanem postopku (Ristic in sod., 1972). Za pripravo fiksiranega razmaza smo uporabili bakterijo *A. phagocytophilum*, gojeno v celični kulturi HL60. Filtrirali smo vzorce seruma, prvotno razredčene v razredčitvi 1:128, v PBS z dodatkom 1 % kunčjega seruma. Razredčene serume smo nanesli na stekelca in jih inkubirali v vlažilni komori pri 37 °C 30 minut. Po inkubaciji smo stekelca trikrat sprali v PBS in posušili na zraku. Razmaz smo prelili s kunčjim protiserumom proti pasjim IgG, označenim s fluorescein izotiocianatom (Sigma–Aldrich, MO, USA), razredčenim v razredčitvi 1:64. Stekelca smo ponovno trikrat sprali v PBS, pri drugem spiranju z dodatkom 5 % Eriochrome Black T (Sigma–Aldrich, MO, USA). Vzorce, pri katerih smo s fluorescentnim mikroskopom ugotovili intracelularne inkluzije v razredčini 1:128, smo šteli kot pozitivne. Nadaljnje razredčitve si tako sledijo: 1:256, 1:512, 1:1024, 1: 2048, >1:2048.

3.4.2 Verižna reakcija s polimerazo

Za izvedbo PCR metode za ugotavljanje DNA bakterije *A. phagocytophilum* iz polne krvi smo najprej osamili levkocite, iz teh pa smo osamili DNA s pomočjo QuiAmp DNA mini kitov po navodilih proizvajalca (Qiagene GmbH, Hilden, Nemčija). Za pregledovanje vseh vzorcev smo uporabili začetni nukleotid Ehr521 (TGTAGGCCTTCGGTAAGTTAAAG) in Ehr790 (CTTAACGCGTTAGCTACAACACAG). Pomnoženi fragmenti velikosti 293-bp so specifični za 16S rRNA rodov *Anaplasma* in *Ehrlichia* (Kolbert, 1996). Pozitivne vzorce smo dodatno testirali še z *groESL* operonom. Vsi amplifikoni so bili potrjeni s sekveniranjem.

3.4.2.1 Določanje aminokislinskega in nukleotidnega zaporedja – sekveniranje

Po končanem PCR smo pridelke reakcije očistili s komercialnim kompletom reagentov Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA). Očiščene pridelke PCR smo preverili z gelsko elektroforezo in glede na količino pridelka semikvantitativno ocenili koncentracijo DNA. Pripravili smo sekvenčno reakcijo, za katero smo uporabili komercialni kompleti reagentov BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Po končani reakciji in ponovnem čiščenju pridelkov smo vzorcem določili nukleotidno zaporedje z avtomatskim genetskim analizatorjem ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA) in programskim paketom BDx Standard Sequencing Reaction (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

3.5 Ugotavljanje bolezenskih znakov in laboratorijskih sprememb

3.5.1 Klinični pregled

S kliničnim pregledom smo pri pacientih ugotavljeni prizadetost posameznih organskih sistemov. Razvrstili smo jih v 11 skupin glede na klinična odstopanja in anamnestične podatke (Tabela 2).

Tabela 2: Razdelitev kliničnih znakov v skupine glede na prizadeti organski sistem ali prisotni simptom

Skupina	Klinični znaki
1 kosti, sklepi	šepanje, težko vstajanje, hitro utrujanje, boleči in otečeni sklepi
2 prebavila	bruhanje, anoreksija, driska, obstipacija, povečano/zmanjšano pitje
3 osrednje živčevje	težave z ravnotežjem, zanašanje, epileptiformni napadi, izguba zavesti, paraliza
4 krvavitve	melena, hematurija, podplutbe, hematomi, krvavitev iz gobca
5 koža	srbež, buli, rane, edemi
6 dihala	kašelj, hropenje, sopenje
7 sečila	boleče področje ledvic, polakiurija, disurija, poliurija
8 povišana temperatura	
9 splošni znaki	oslabelost, apatija, tresenje
10 onkološka obolenja	limfom, hemangiosarkom, tumor mlečne žleze, tumor na črevesju
11 brez kliničnih znakov	

3.5.2 Hematološke preiskave

Hematološko analizo krvi smo opravili na avtomatskem laserskem hematološkem analizatorju Technicon H1™ system (Siemens-Bayer, Nemčija), s programom za uporabo v veterinarski medicini, s pomočjo katerega smo dobili podatke o številu levkocitov, številu eritrocitov, koncentraciji hemoglobina, hematokritu, številu trombocitov in diferencialni beli krvni sliki. V retrospektivnem delu smo ugotovili, da je pri psih z anaplazmo statistično najznačilnejše odstopanje v številu trombocitov. Ostali hematološki parametri ne odstopajo statistično

značilno od kontrolne skupine, zato smo se v prospektivnem delu osredotočili zgolj na vrednotenje števila trombocitov znotraj posameznih skupin psov.

3.5.3 Biokemijske preiskave krvnega seruma

Biokemijske preiskave smo opravili na avtomatskem biokemijskem analizatorju Technicon® RA-XT™ (Siemens-Bayer, Nemčija), s katerim smo dobili podatke o koncentraciji sečnine in kreatinina ter vrednosti alkalne fosfataze (AP), alanin aminotransferaze (ALT) in kalcija v krvi. Podatke o koncentraciji natrija, kalija in klora v krvi smo dobili z elektrolitskim analizatorjem ILyte (Na^+ K^+ Cl^- system, Instrumentation Laboratory, Lexington, ZDA).

3.6 Ugotavljanje hiperglobulinemije

Hiperglobulinemijo smo ugotavljali z elektroforezo serumskih proteinov v agaroznem gelu. Preiskavo so izvedli v Laboratorio Analisi chimico-cliniche, Tigullio, Genova, Italija. Ker smo vzorce preiskovanih serumov za to preiskavo pošiljali serijsko, smo jih po odvzemu in centrifugiraju konzervirali z zamrzovanjem pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.6.1 Elektroforeza serumskih proteinov v agaroznem gelu

Z elektroforezo separiramo serumske proteine v pet glavnih frakcij: albumine, alfa-1-, alfa-2 globuline, beta- in gama globuline. Postopek smo izvedli s HYDRASYS sistemom, ki je avtomatiziran v vseh korakih procesiranja HYDRAGEL agaroznega gela, in sicer v nanašanju vzorca, elektroforetski migraciji, sušenju, barvanju in razbarvanju ter končnem sušenju produkta. Kot vzorec smo uporabili $10\text{ }\mu\text{l}$ seruma, ki smo ga predhodno odtalili. Migracija je potekala pri 10W pri $20\text{ }^\circ\text{C}$ približno sedem minut. Za barvanje produktov smo uporabili barvilo amidoblack. Rezultate smo odčitali z densitometrom pri valovni dolžini 570 nm .

3.7 Ugotavljanje cirkulirajočih imunskih kompleksov v krvi

CIC-e smo iz seruma osamili s precipitacijo s polietilen glikolom (Day, 1987). Po osamitvi iz imunskih kompleksov smo imunoglobuline dokazovali z nefelometrijo z uporabo dvožarkovnega spektrofotometra pri valovni dolžini 340 nm po že opisanem postopku (Levinson in Goldman, 1983).

3.7.1 Precipitacija imunskih kompleksov s polietilen glikolom

V 0,5 ml vzorca preiskovanega seruma smo dodali 1,5 ml 33 g/l PEG 6000 v 10 mM PBS in 0,15 M NaCl, pH 7,4. Inkubirali smo čez noč pri 4 °C. Nato smo centrifugirali 30 minut pri 4 °C na 2000 g. Supernatant smo odpipetirali in zavrgli, pelet pa resuspendirali v 2 mL ledenega 25 g/L PEG 6000 v 10 mM PBS z 0,15 M NaCl z vorteksiranjem. Centrifugirali smo 30 minut pri 4 °C na 2000 g. Supernatant smo ponovno odpipetirali in zavrgli, pelet pa resuspendirali v 0,5 mL 10 mM Tris pufra + 0,15 M NaCl z vorteksiranjem. Reprecipitirali smo z dodatkom 1,5 mL 33 g/L PEG 600 v 10 mM PBS + 0,15 M NaCl, pH 7,5. Ponovno smo inkubirali čez noč pri 4 °C, nato pa centrifugirali 30 minut pri 4 °C na 2000 g. Supernatant smo odpipetirali in zavrgli, pelet pa resuspendirali v 0,5 mL 10 mM Tris pufra z 0,15 M NaCl z vorteksiranjem. Tako smo dobili serumski ekstrakt, ki smo ga uporabili nadalje v nefelometriji.

3.7.2 Nefelometrija z dvožarkovnim spektrofotometrom

V 770 µL testne raztopine in slepe probe smo dodali 110 µL ekstrakta seruma pacientov in kontrol (PEG je v končni koncentraciji 5,5 g/L). Delali smo v duplikatu. Prav tako smo v 770 µL testne raztopine in slepe probe dodali 110 µL kalibratorja. Inkubirali smo 30 minut na sobni temperaturi. Vzorce smo prenesli v zožano kvarčno kiveto in pomerili absorbanco na spektrofotometru pri 340 nm. Razlika v absorbanci med testno raztopino in slepim vzorcem je posledica reakcije med anti-IgG z IgG v vzorcu. Narisali smo umeritveno krivuljo odvisnosti absorbance od koncentracije kalibratorjev in iz povprečne absorbance vzorca izrazili koncentracijo imunskih kompleksov v preiskovanem serumu.

Priprava testne raztopine, slepe probe, s toploto agregiranih γ globulinov in kalibratorjev je prikazana v Tabeli 3.

Tabela 3: Priprava raztopin za postopek nefelometrije

raztopine	priprava
slepa proba	6,3 g/L PEG 6000 v 15 mM PBS + 0,15 M NaCl
testna raztopina	225 µL protipasjih IgG v 13,5 mL slepe probe
kalibrator	AGG + 10 mM Tris pufra + 0,15 M NaCl + 20 g/L BSA, pH 7,4; končna koncentracija 12,5 – 400 mg/L
AGG	300 mg Dog Cohn Fraction II + 15 mL 15 mM PBS + 0,15 M NaCl, pH 7,4 na ledu segrevanje 20 min, 63 °C, na led centrifugiranje 60 min, 4 °C, 150.000 g resuspendiranje peleta v 5 mL 15 mM PBS + 0,15 M NaCl, pH 7,4 na ledu s pomočjo steklenega (Dounce) homogenizatorja centrifugiranje 60 min, 4 °C, 150.000 g resuspendiranje peleta v 5 mL 10 mM PBS + 0,15 M NaCl, pH 7,4 na ledu določanje koncentracije proteinov (Biuretska reakcija, BioRadov reagent) – raztopina naj bi vsebovala 6 – 6,8 g/L AGG redčenje z 10 mM PBS + 0,15 M NaCl, pH 7,4 do koncentracije 4 g/L, hranjenje na – 80 °C (obstojno več mesecev)

3.8 Ugotavljanje prisotnosti in vrste proteinurije

3.8.1 Urinogram

Analizo urina smo opravili s testnim trakom na urinskem analizatorju CLINITEK 50 (Siemens-Bayer, Nemčija), ki oceni tudi prisotnost proteinov. Z mikroskopom smo pregledali urinski sediment (centrifugiranje pri 800 obratih 10 minut); ugotavliali smo prisotnost eritrocitov, levkocitov, epitelnih celic, cilindrov, kristalov, maščobnih kapljic in bakterij.

3.8.2 Razmerje med proteini in kreatininom v urinu

Skupne proteine v urinu smo kvantitativno zmerili z avtomatskim biokemijskim analizatorjem Daytona RX (Randox, Crumlin, Velika Britanija). Določili smo UPC, s katerim ločimo med renalno in ekstrarenalno proteinurijo.

3.8.3 Elektroforeza urinskih proteinov

S SDS-PAGE smo ločili proteine v urinu glede na njihovo molekularno težo. Na podlagi te lahko sklepamo na mesto poškodbe v ledvicah. Kot vzorec smo uporabili urinski supernatant po centrifugiraju pri 800 obratih 10 min. Glede na koncentracijo proteinov v supernatantu smo vzorec redčili 1:1 ali 3:1. Elektroforezo smo izvedli po že opisanem postopku (Laemmli, 1970), vendar brez uporabe reducenta. Pripravili smo gele z 10,4-odstotno zamreženostjo v separacijskem delu in 4-odstotno zamreženostjo v koncentracijskem delu. Elektroforeza je potekala 45 minut pri 200 V. Po končani elektroforezi smo gel pobarvali s Comassie Brilliant Blue barvilom. Rezultate smo ovrednotili z vizualnim pregledom, ki je enako zanesljiv kot odčitavanje z densitometrom (Stierle in sod., 1990; Woo in sod., 1991).

3.9 Statistične metode

Za statistično obdelavo podatkov smo pse razdelili v štiri skupine: v DefNeg smo uvrstili pse, ki po trenutno veljavni definiciji (Björsdorf, 2005) niso bolni (IFA titer \leq 1:1024), v DefPos smo uvrstili pse, ki so po trenutno veljavni definiciji bolni (IFA titer \geq 1:2048 + trombocitopenija in/ali klinični znaki). V drugih dveh skupinah so bili PCR pozitivni in PCR in IFA negativni psi (kontrolna skupina). Vse podatke smo primerjali med skupinami s Kruskal – Wallisovim testom in testom hi – kvadrat. Statistična značilnost je bila definirana kot $P < 0,05$.

Za statistično obdelavo hematoloških in biokemijskih parametrov smo uporabili komercialni statistični program (Sigma-Plot 11; Systat Software, Inc., USA). Vseh sedem skupin (šest skupin z IFA titrom od 1:128 do > 1:2048) in PCR pozitivno skupino smo v izbranih parametrih primerjali s kontrolno skupino z Mann-Whitneyevim Rank Sum testom ali neparnim t-testom v primeru normalne porazdelitve. Za primerjavo parametrov znotraj skupin smo uporabili One-way ANOVA test po Dunnovi ali Holm-Sidakovi metodi. Statistična značilnost je bila definirana kot $P < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 Retrospektivna študija

4.1.1 Pogostost okužbe z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum*

V retrospektivni študiji smo pregledali kartoteke 749 psov, od katerih je bilo 553 psov IFA in/ali PCR pozitivnih na bakterijo *A. phagocytophilum*, kar predstavlja 73,8-odstotno pogostost okužbe. 547 psov (98,9 %) od okuženih je bilo IFA pozitivnih, od tega 23 tudi PCR pozitivnih (4,2 %). IFA negativnih in PCR pozitivnih je bilo šest psov (1,1 %) (Tabela 4).

4.1.2 Ugotavljanje specifičnih protiteles proti bakteriji *Anaplasma phagocytophilum* z IFA

Serološko je bilo pregledanih 749 psov, od katerih je bilo 547 psov IFA pozitivnih (73,0 %). Pri 61 (11,2 %) psih je bil ugotovljen mejni titer protiteles 1:128, pri 106 (19,4 %) je bil titer 1:256, pri 107 (19,5 %) 1:512, pri 141 (25,8 %) 1:1024, pri 44 (8,0 %) 1:2048 in pri 88 (16,1 %) > 1:2048 (Tabela 4).

Ob upoštevanju kriterija, da bolezen lahko potrdimo, kadar so prisotni klinični znaki bolezni in štirikratni mejni titer protiteles (Björsdorf, 2005), je bilo takih psov skupno 132 (24,1 %).

Tabela 4: Število in odstotek psov glede na IFA in/ali PCR pozitiven rezultat

Skupina	IFA titer (n (%))					Skupaj
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
IFA	61 (11,2)	106 (19,4)	107 (19,5)	141 (25,8)	44 (8,0)	88 (16,1)
PCR+IFA	1 (3,4)	0	1 (3,4)	8 (27,6)	5 (17,2)	8 (27,6)
PCR						6 (1,1)

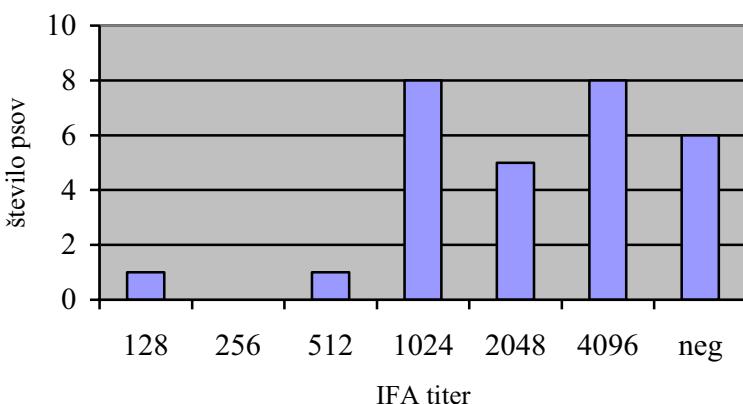
n, število psov; **poudarjeno**, psi z akutno anaplazmozo po trenutno veljavnih kriterijih

4.1.3 Dokazovanje bakterije *Anaplasma phagocytophilum* s PCR

S PCR smo preiskali 548 vzorcev krvi, med katerimi je bilo 29 (5,3 %) vzorcev pozitivnih in 519 (94,7 %) negativnih. Med PCR pozitivnimi je bilo 17 (58,6 %) samcev in 12 (41,4 %) samic. Njihova povprečna starost je bila 6,5 let (od 1 do 14 let). Najpogosteje smo povzročitelja dokazali pri labradorcih (17,2 %), zlatih prinašalcih in križancih (13,8 %) ter nemških ovčarjih (10,3 %). Pasemska porazdelitev se ujema s porazdelitvijo glede na vse IFA

in/ali PCR pozitivne pse in je prej odraz priljubljenosti posameznih pasem v Sloveniji kot pa povečane dovzetnosti prevladujočih pasem za okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum*.

Med PCR pozitivnimi psi je imel en pes IFA titer protiteles 1:128, en pes 1:512, osem psov 1:1024, 5 psov 1:2048, osem psov $> 1:2048$, šest psov je bilo IFA negativnih (Graf 1).

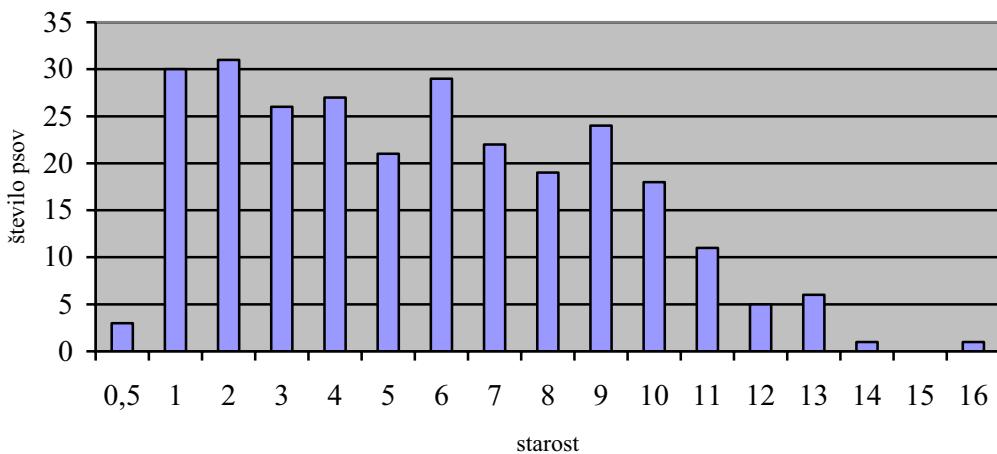


Graf 1: Porazdelitev PCR pozitivnih psov glede na IFA titer

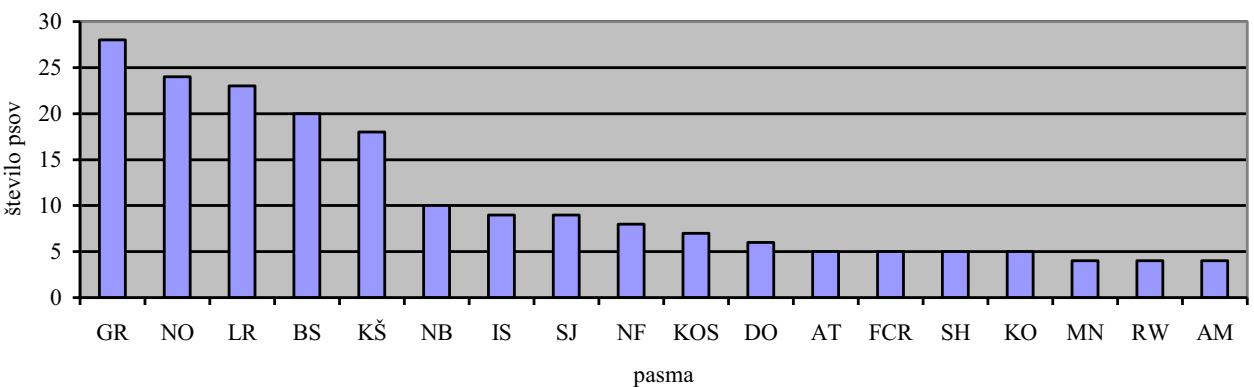
4.1.4 Porazdelitev glede na starost, spol in pasmo

Spol in pasmo smo ocenjevali pri 339-ih, starost pa pri 274-ih psih, za katere smo imeli podatke za omenjene parametre.

Med psi v raziskavi prevladujejo samci – 191 (56,4 %) samcev in 148 (43,6 %) samic. Povprečna starost je 5,7 let (0,5–16 let) (Graf 2). Prevladujejo križanci (15 %), od pasemskeih psov pa zlati prinašalci (GR) (8,3 %), nemški ovčarji (NO) (7,1 %), labradorci (LR) (6,8 %), bernski planšarski psi (BS) (5,9 %) in koker španjeli (KS) (5,3 %). Manj pogosto se pojavijo še nemški bokserji (NB) (3,4 %), irski setri (IS) in samojedi (SJ) (2,6 %), novofundlandci (NF) (2,4 %), srednji kodri (KOS) (2,1 %), dobermani (DO) (1,8 %), airdalski terierji (AT), gladkodlaki prinašalci (FCR), sibirski huskiji (SH) in kraški ovčarji (KO) (1,5 %) ter belgijski ovčarji malinois (MN), rotvajlerji (RW) in aljaški malamuti (AM) (1,2 %) ter ostali (Graf 3).



Graf 2: Porazdelitev psov glede na starost



Graf 3: Porazdelitev psov glede na pasmo

V starostni, spolni in pasemski porazdelitvi med skupinami z različnimi IFA titri ali PCR pozitivnim rezultatom ni bilo bistvenih razlik.

4.1.5 Pojavnost kliničnih znakov

Zbrali smo podatke o kliničnih znakih pri 273-ih psih, od tega 223-ih IFA pozitivnih, 31-ih PCR pozitivnih in 19-ih IFA in PCR negativnih (kontrolna skupina).

Psi z nižjimi IFA titri (1:128 – 1:1024) so imeli širši spekter kliničnih znakov kot tisti z višjimi titri ($\geq 1:2048$) in PCR pozitivnim rezultatom. Prevladujoči klinični znaki v vseh skupinah so bili povišana telesna temperatura, letargija in anoreksija ter šepanje in

gastrointestinalni znaki. Relativno nizko število psov z nizkimi titri protiteles je bilo brez kliničnih znakov, vsi v IFA skupini 1:128. Prav tako je bilo 9,7 % PCR pozitivnih psov brez kliničnih znakov (Tabela 5).

Statistično značilno odstopanje smo ugotovili v kliničnih znakih iz skupine 1 (kosti, sklepi: šepanje, težko vstajanje, hitro utrujanje, boleči in otekli sklepi) in skupine 9 (splošno: oslabelost, apatija, tresenje). Psi z IFA titrom $\geq 1:2048$ so večkrat (60,3 %) kazali klinične zname iz skupine 1 kot PCR+ (35,5 %) in psi z nižjimi IFA titri (35,6 %) ($P < 0,005$). PCR pozitivni psi so večkrat (41,9 %) kazali klinične zname iz skupine 9 v primerjavi s psi z IFA titrom $\geq 1:2048$ (30,1 %) in psi z nižjimi IFA titri (17,8 %) ($P < 0,005$). Tudi primerjava PCR pozitivnih z vsemi IFA pozitivnimi psi za klinične zname iz skupine 9 je pokazala statistično značilno razliko (41,9 proti 21,3 %) ($P < 0,05$).

Tabela 5: Pojavnost kliničnih znakov (%) glede na IFA titer in PCR

klinični znaki	IFA titer	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	>1:2048	DefNeg	DefPos	PCR	KS
n	35	36	33	46	36	37	150	73	31	19	0
↑ temperatura, letargija, anoreksija	28,6	22,2	27,3	30,4	25,0	51,4	27,3	38,4	54,8**		
šepanje	48,6	33,3	42,4	45,6	55,5	64,9	42,6	60,3*	35,5	0	
gastrointestinalni znaki	20,0	22,2	12,1	13,0	16,7	13,5	16,7	15,1	16,1	0	
spontane krvavitve	8,6	8,3	12,1	4,3	11,1	8,1	8,0	9,6	3,2	0	
kožna obolenja	11,4	5,5	3,0	15,2	2,8	8,1	9,3	5,5	3,2	0	
epileptiformni napadi	8,6	13,9	6,1	0	2,8	0	6,7	1,4	0	0	
respiratorna ali urinarna obolenja	8,6	11,1	6,1	4,3	0	10,8	7,3	5,5	6,4	0	
brez kliničnih znakov	0	11,1	12,1	15,2	19,4	5,4	10	12,3	9,7	100	

n, število psov; **poudarjeno**, psi z aktivno anaplazmozo po trenutno veljavnih kriterijih; DefNeg, psi z IFA titri $\leq 1:1024$; DefPos, psi z IFA titri $\geq 1:2048$; KS, kontrolna skupina; * statistično značilno različno od DefNeg in PCR; ** statistično značilno različno od vseh IFA+

4.1.6 Hematološki parametri

Hematološke parametre smo ocenjevali pri 149-ih IFA in/ali PCR pozitivnih psih in pri 19-ih psih v kontrolni skupini. Med 129-timi serološko pozitivnimi psi jih je imelo 16 (12,4 %) IFA titer 1:128, 29 (22,5 %) titer 1:256, 23 (17,8 %) titer 1:512, 29 (22,5 %) titer 1:1024, 16 (12,4 %) titer 1:2048 in 16 (12,4 %) $>1:2048$. PCR pozitivnih je bilo 20 psov. Rezultate o mediani, minimalni/maksimalni vrednosti in primerjave med posameznimi skupinami za izbrane hematološke parametre (WBC, RBC, Hct, PLT, Neutro, Lympho, Mono) prikazujemo v Tabeli 6.

Pri psih v naši raziskavi smo zaznali statistično značilna odstopanja v primerjavi s kontrolno skupino v vseh preiskovanih hematoloških parametrih z izjemo WBC (Tabela 6). Mediane vrednosti za Neutro so bile statistično značilno višje in za Lympho ter Mono statistično značilno nižje kot v kontrolni skupini. Mediane vrednosti za RBC, Hct in PLT so bile statistično značilno nižje kot v kontrolni skupini, z izjemo skupine z IFA titrom $> 1:2048$, kjer sta bili mediana in povprečna vrednost PLT v referenčnih mejah. Kljub vsemu pa vsi parametri z izjemo PLT ostajajo znotraj referenčnih vrednosti, odstopajo le v primerjavi s kontrolno skupino. Med skupinami z različnimi IFA titri in PLT ni bilo statistično značilne korelacije ($P < 0,05$).

Primerjali smo tudi ostale hematološke parametre, vendar rezultati niso prikazani zaradi izjemno majhnih razlik. Mediane vrednosti za HGB so bile statistično značilno nižje v vseh IFA in v PCR pozitivni skupini v primerjavi s kontrolno skupino ($P < 0,05$). Mediane vrednosti za MCV, MCHC in MPV so bile statistično značilno višje zgolj v posameznih IFA skupinah.

4.1.7 Biokemijski parametri

Biokemijske parametre smo določevali v manj številnih vzorcih: sečnino in kreatinin v 65-ih vzorcih, AP in ALT v 30-ih, skupne serumske proteine v 28-ih, albumine v 24-ih in elektrolite v 32-ih vzorcih seruma ter pri vseh psih iz kontrolne skupine.

V primerjavi izbranih biokemijskih parametrov smo našli le nekaj statistično značilnih razlik. Mediana vrednost za AP je bila statistično značilno višja v skupinah z IFA titri 1:128, 1:256, 1: 1024, $> 1:2048$ in PCR pozitivni skupini v primerjavi s kontrolno skupino ($P < 0,05$).

Tabela 6: Primerjava rezultatov hematoloških preiskav med skupinami okuženih psov (razdeljenih glede na IFA titer protiteles proti *A. phagocytophilum* ali PCR pozitiven rezultat) in kontrolno skupino psov

skupina	parameter	WBC (6,0-18,0x10 ⁹ -1)	RBC (5,1-8,5x10 ¹² -1)	Hct (0,35-0,55 l-1)	PLT (200-500x10 ⁹ -1)	Neutro (60-80 %)	Lympho (12-30 %)	Mono (3-10 %)
1:128 (n = 16)		11,01 6,52 – 58,38	3,64 – 8,18	0,26 – 0,55	6,0 – 305,0	61,6 38,7 – 88,4	25,0 4,5 – 41,6	5,0 0,6 – 10,1
1:256 (n = 29)		9,88 4,72 – 26,82	3,05 – 8,39	0,22 – 0,62	9,0 – 381,0	67,1 33,4 – 93,9	19,6 0,6 – 43,7	5,4 0,5 – 14,6
1:512 (n = 23)		11,29 5,14 – 48,48	3,41 – 8,91	0,24 – 0,62	27,0 – 333,0	67,2 15,9 – 82,8	20,2 5,9 – 60,3	4,5 0,5 – 11,6
1:1024 (n = 29)		3,07 – 44,35 ^a	2,03 – 8,44	0,14 – 0,56	10,0 – 398,0	187,5 ^a	71,6 48,0 – 88,2	19,1 5,4 – 40,5
1:2048 (n = 16)		10,30 6,41 – 13,90	1,87 – 8,60	0,16 – 0,53	13,0 – 379,0	65,0 ^a	22,6 51,3 – 85,5	4,3 9,7 – 33,3
□ 1:2048 (n = 16)		9,70 4,26 – 20,70	4,57 – 8,28	0,32 – 0,57	69,0 – 346,0	63,4 ^a	26,9 45,5 – 76,6	4,6 11,0 – 43,0
PCR pozitivni (n = 20)		9,75 3,79 – 21,90	1,87 – 8,91	0,34 – 0,55	8,0 – 364,0	71,6 0,53	20,4 42,2 – 89,3	3,1 6,9 – 44,7
kontrolna sk. (n = 19)		9,80 6,72 – 12,82	7,68 7,05 – 8,97	0,46 – 0,60	220,0 – 452,0	57,1 45,4 – 74,8	30,6 11,4 – 46,6	5,0 0,4 – 13,9

n, število psov^x statistično značilno različno od kontrolne skupine, P □ 0,05. ^a statistično značilno različno od PCR pozitivnih psov, P □ 0,05.

statistično značilno različno od kontrolne skupine, P ≤ 0,001.

4.1.8 Sočasna okužba z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Pri 113-ih psih smo sočasno z bakterijo *A. phagocytophilum* z IFA testirali tudi na prisotnost okužbe z bakterijo *B. burgdorferi s. l.*. Pri 34-ih psih (30,1 %) smo okužbo tudi potrdili v različnih titrih protiteles glede na mejni titer, ki ga postavlja laboratorij (1:100). Pri večini psov, sočasno okuženih z bakterijama *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi s.l.*, je od kliničnih znakov prevladovalo šepanje (55,9 %), sledili so mu apatija (14,7 %) in respiratorne težave (11,7 %). En pes (2,9 %) je bil brez kliničnih znakov.

4.2 Prospektivna študija

4.2.1 Določanje aminokislinskega in nukleotidnega zaporedja - sekveniranje

Sekvenirali smo PCR pridelke pri 98-ih psih. Na osnovi nukleotidnega zaporedja smo uvrstili pridelek v eno izmed dveh različic bakterije *A. phagocytophilum*, ki se po trenutno znanih podatkih pojavljata pri psih v Sloveniji. Genetski različici se razlikujeta v treh nukleotidih (99,76-odstotna podobnost) v zaporedju odseka *groESL* operona. Poimenovani sta različica d-3216 in d-2551. V naši raziskavi sta označeni kot različica H (pojavlja se pri psih in človeku) in različica P (pojavlja se izključno pri psih). Različico H smo ugotovili pri 52-ih vzorcih, različico P pa pri 46-ih vzorcih. Zanimalo nas je, če je pogostnost posameznih kliničnih znakov različna med obema različicama. Zbrali smo podatke o klinični sliki pri 31-ih vzorcih različice H in 24-ih vzorcih različice P. Najpogosteji klinični znaki pri obeh različicah so bili znaki akutnega infekcijskega sindroma (72,7 %), šepanje (43,6 %) in gastrointestinalni znaki (21,8 %). Šepanje je bilo dokaj enakomerno porazdeljeno med različicama (41,7 % pri P, 45,2 % pri H), prav tako gastrointestinalni znaki (20,8 % pri P, 22,6 % pri H). Znaki akutnega infekcijskega sindroma pa so se izraziteje pojavili pri različici H (71,0 %) v primerjavi z različico P (29,2 %), kar je bilo tudi statistično značilno ($P < 0,05$).

4.2.2 Ugotavljanje trombocitopenije

Ker je trombocitopenija najbolj značilno hematološko odstopanje pri anaplazmozi, smo število trombocitov ovrednotili še na večjem številu vzorcev in skupine primerjali med sabo. Pregledali smo 301 vzorec polne krvi, in sicer 32 vzorcev iz skupine 1:128, 41 iz skupine 1:256 in 1:512, 56 iz skupine 1:1024, 39 iz skupine 1:2048, 44 iz skupine $> 1:2048$, 26 iz skupine PCR pozitivnih in 19 iz kontrolne skupine. Trombocitopenija je bila prisotna v vseh

skupinah z izjemo skupine z najvišjim IFA titrom in kontrolne skupine. Najizrazitejša je bila v PCR pozitivni skupini (Tabela 7).

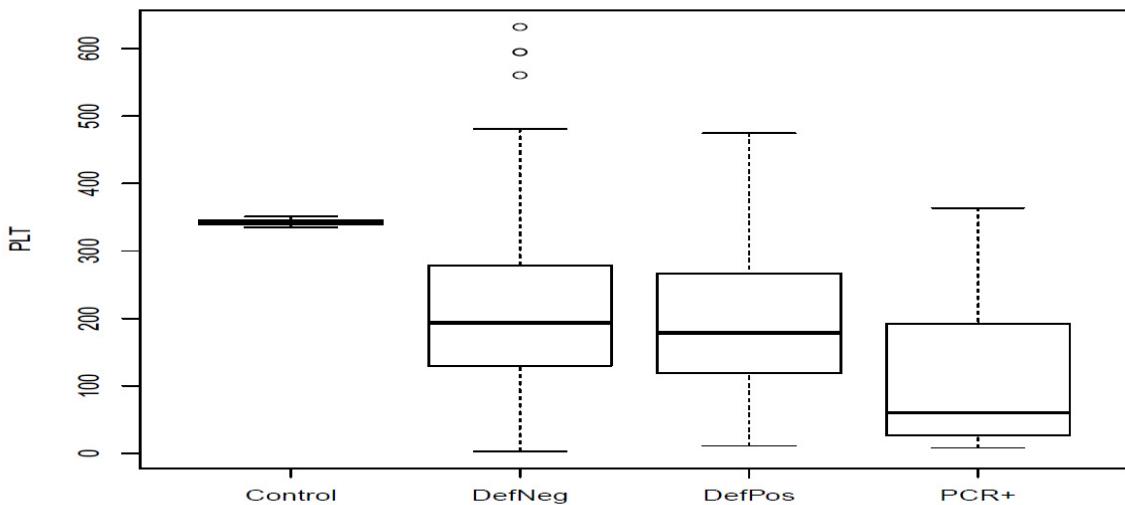
Statistično značilne razlike ($P < 0,001$) so se pojavile v primerjavi skupine psov z IFA titri $\leq 1:1024$ s kontrolno skupino, IFA titri $\geq 1:2048$ s kontrolno skupino, PCR pozitivnih s kontrolno skupino in tudi PCR pozitivnih s skupino z IFA titri $\leq 1:1024$ in $\geq 1:2048$ ($P < 0,05$) (Graf 4).

Tabela 7: Število trombocitov ($\times 10^9/l$) pri okuženih (razdeljenih v skupine glede na IFA titer ali PCR+ rezultat) in psih v kontrolni skupini (KS)

	IFA 1:128	titer 1:256	1:512	1:1024	1:2048	> 1:2048	PCR	KS
<i>n</i>	32	41	41	56	39	44	26	19
mediana	191	170	191	197	194	223	60	342
min – max	6 – 560	9 – 381	5 – 595	3 – 414	11 – 475	32 – 414	8 – 364	335 – 351

n, število psov

referenčna vrednost trombocitov: $200 – 500 \times 10^9/l$

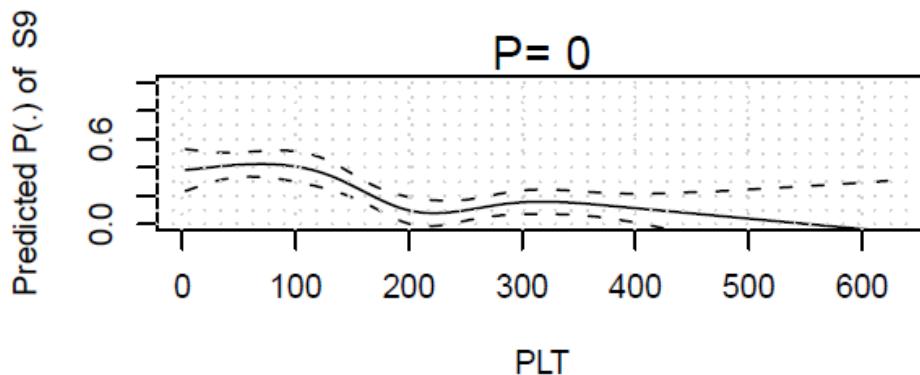


Control, kontrolna skupina; DefNeg, IFA titri $\leq 1:1024$; DefPos, IFA titri $\geq 1:2048$

Graf 4: Statistično značilna razlika v številu trombocitov med posameznimi skupinami

Ugotavljali smo tudi povezavo med trombocitopenijo in pojavnostjo posameznih kliničnih znakov (Graf 5, 6, 7). Dokazali smo statistično značilno povezavo med trombocitopenijo in pojavnostjo znakov akutnega infekcijskega sindroma in gastrointestinalnih znakov. Z

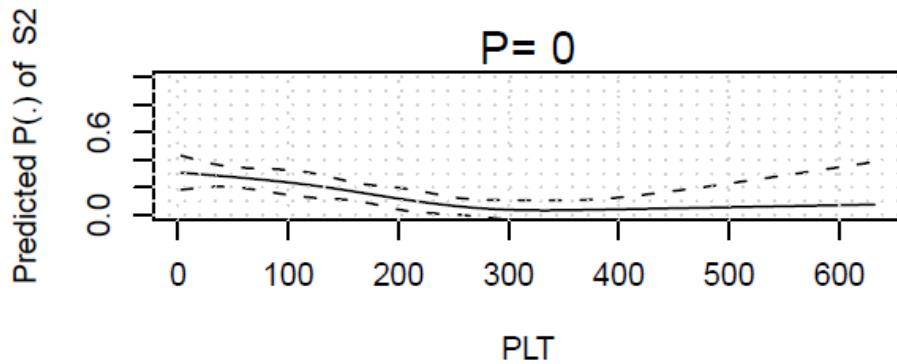
naraščanjem trombocitov je povezana pojavnost šepanja. Šepanje je bilo namreč najpogosteje v skupini psov z najvišjim IFA titrom, v kateri so bili izmed vseh trombociti v referenčnih vrednostih.



S9, znaki akutnega infekcijskega sindroma – povišana telesna temperatura, letargija, inapetenca

Graf 5: Statistično značilna povezava med številom trombocitov in pojavnostjo znakov akutnega infekcijskega sindroma

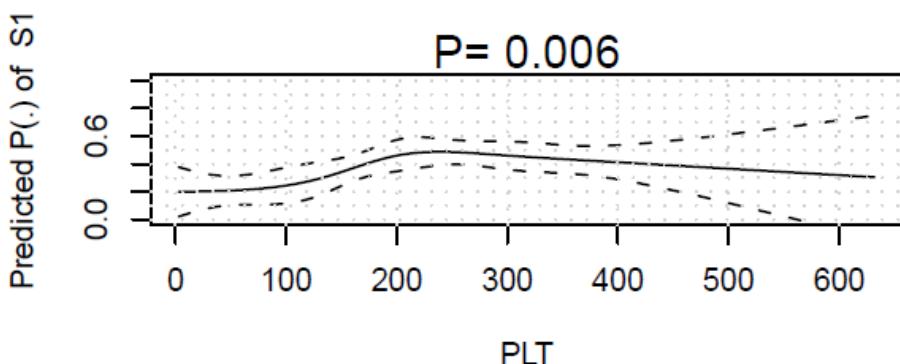
Psi s trombocitopenijo imajo statistično značilno večjo verjetnost za pojav kliničnih znakov akutnega infekcijskega sindroma v primerjavi s psi, pri katerih so trombociti znotraj referenčnih vrednosti.



S2, gastrointestinalni znaki

Graf 6: Statistično značilna povezava med številom trombocitov in pojavnostjo gastrointestinalnih znakov

Psi s trombocitopenijo imajo statistično značilno večjo verjetnost za pojav gastrointestinalnih znakov v primerjavi s psi, pri katerih so trombociti znotraj referenčnih vrednosti.



S1, klinični znaki, povezani s skeletnomišičnim sistemom – šepanje, težko vstajanje

Graf 7: Statistično značilna povezava med številom trombocitov in pojavnostjo šepanja

Psi s trombocitopenijo imajo statistično značilno manjšo verjetnost za pojav kliničnih znakov, povezanih s skeletno-mišičnim sistemom v primerjavi s psi, pri katerih so trombociti znotraj referenčnih vrednosti.

4.2.3 Elektroforeza serumskih proteinov

Elektroforezo serumskih proteinov smo opravili pri 159-ih vzrocih, in sicer jih je bilo 20 iz skupine 1:128, 22 iz skupine 1:256, 23 iz skupine 1:512, 22 iz skupine 1:1024, 16 iz skupine 1:2048, 24 iz skupine > 1:2048, 18 PCR pozitivnih in 14 iz kontrolne skupine (Tabela 8).

Tabela 8: Rezultati elektroforeze serumskih proteinov (g/dl) (povprečje ± standardna deviacija) pri skupinah z različnimi IFA titri, PCR pozitivni in kontrolni skupini

	IFA titer vsi titri	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	>1:2048	PCR	KS
n	127	20	22	23	22	16	24	18	14
TP	7,19 ± 1,25	6,55 ± 1,60	7,07 ± 1,07	7,25 ± 1,07	7,28 ± 1,44	7,06 ± 0,94	7,79 ± 1,02	6,43 ± 1,03	6,26 ± 0,46
A	3,56 ± 0,81	3,42 ± 0,68	3,44 ± 0,91	3,78 ± 0,60	3,42 ± 0,88	3,50 ± 0,69	3,75 ± 0,96	3,13 ± 0,64	3,38 ± 0,53
G	3,66 ± 0,84	3,55 ± 0,76	3,61 ± 1,17	3,47 ± 0,73	3,86 ± 0,92	3,56 ± 0,68	3,88 ± 0,66	3,31 ± 0,72	2,91 ± 0,42
A/G	1,14 ± 0,86	1,41 ± 1,70	1,11 ± 0,58	1,12 ± 0,26	0,92 ± 0,30	1,02 ± 0,26	1,01 ± 0,23	0,98 ± 0,28	1,20 ± 0,28
α-1	0,30 ± 0,26	0,27 ± 0,09	0,28 ± 0,09	0,26 ± 0,05	0,29 ± 0,11	0,27 ± 0,04	0,39 ± 0,56	0,25 ± 0,07	0,35 ± 0,11
α-2	1,43 ± 0,41	1,39 ± 0,43	1,35 ± 0,51	1,34 ± 0,35	1,47 ± 0,39	1,49 ± 0,36	1,53 ± 0,40	1,26 ± 0,36	0,98 ± 0,13
β-1-2	0,64 ± 0,22	0,60 ± 0,20	0,68 ± 0,30	0,55 ± 0,17	0,70 ± 0,26	0,57 ± 0,19	0,67 ± 0,17	0,61 ± 0,20	0,38 ± 0,09
β-3	0,77 ± 0,25	0,75 ± 0,21	0,78 ± 0,32	0,77 ± 0,18	0,86 ± 0,33	0,73 ± 0,18	0,81 ± 0,25	0,65 ± 0,16	0,62 ± 0,09
γ	0,56 ± 0,24	0,52 ± 0,23	0,61 ± 0,38	0,59 ± 0,19	0,54 ± 0,24	0,48 ± 0,12	0,58 ± 0,18	0,55 ± 0,18	0,55 ± 0,16

n, število vzorcev; KS, kontrolna skupina; TP, skupni proteini; A, albumini; G, globulini; A/G, razmerje med A in G; α-1 - γ, posamezne frakcije globulinov

Razmerje med albumini in globulini (A/G), nižje od 0,8, kar predstavlja patološki rezultat, smo ugotovili pri 32-ih vzorcih, in sicer pri štirih iz skupine 1:128, osmih iz skupine 1:256, dveh iz skupin 1:512 in > 1:2048, desetih iz skupine 1:1024, enim iz skupine 1:2048, štirih PCR pozitivnih in enim iz kontrolne skupine (Tabela 9). Pri ostalih 127-ih vzorcih je bilo razmerje A/G znotraj referenčnih vrednosti in čeprav smo pri 48-ih od teh vzorcev ugotovili spremembe v elektroforetogramu, jih nismo šteli kot patološke. Spremembe so se namreč pojavile v koncentraciji skupnih proteinov, ki je presegla zgornjo referenčno vrednost, in sicer so bili povišani tako albumini kot globulini. Razlog za tako spremembo je lahko dehidracija ali koncentracija vzorca zaradi evaporacije pri nesvežih vzorcih. Pri dveh vzorcih z razmerjem A/G znotraj referenčnih vrednosti smo ugotovili znižane skupne proteine. Pri enem vzorcu so bili znižani tako albumini kot globulini, pri drugem pa samo globulini. V prvem primeru bi šlo lahko za akutno izgubo krvi, izgubo proteinov skozi prebavila ali ledvica ali odpoved jeter, v drugem pa za imunsko pomanjkljivost. Za nobenega od obeh psov ostali klinični podatki, na podlagi katerih bi lahko ugotovili vzrok za hipoproteinemijo, žal niso bili dostopni.

Pri vzorcih z znižanim razmerjem A/G (32 vzorcev) smo znižane albumine glede na referenčne vrednosti ugotovili v 12-ih (37,5 %) primerih, zvišane v petih (15,6 %). 30 (93,7 %) vzorcev je imelo zvišane globuline, en (3,1 %) vzorec znižane. 12 (37,5 %) vzorcev je imelo zvišane α -1 globuline, 10 (31,3 %) vzorcev znižane. 24 (75,0 %) vzorcev je imelo zvišane α -2 globuline, dva (6,3 %) vzorca znižane. 13 (40,6 %) vzorcev je imelo zvišane β -1-2 globuline. 21 (65,6 %) vzorcev je imelo zvišane β -3 globuline, dva (6,3 %) vzorca pa znižane. 10 (31,3 %) vzorcev je imelo zvišane γ globuline, dva (6,3 %) vzorca pa znižane (Tabela 9).

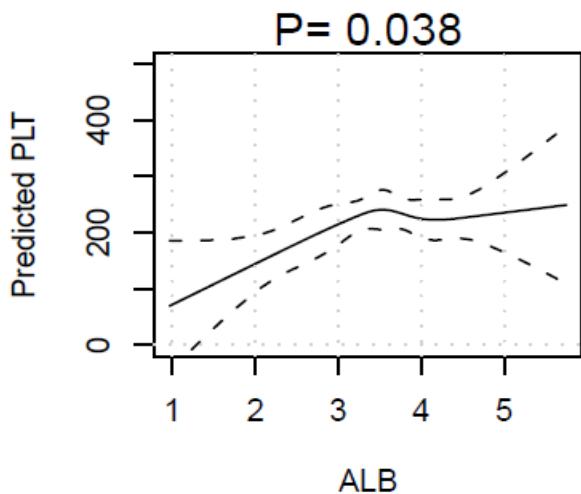
Tabela 9: Rezultati elektroforeze serumskih proteinov – število vzorcev s spremenjenimi frakcijami na elektroforetogramu glede na IFA in PCR

$n < A/G$	IFA titer						DefNeg	DefPos	PCR	KS
	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	> 1:2048				
A↑/A↓	0/2	1/3	1/0	3/2	0/1	0/1	6/8*	0/2	0/2*	0/1
G↑/G↓	6/0	8/0	2/0	10/0	1/0	2/0	26/1*	3/0*	2/1	0/0
$\alpha_1\uparrow/\alpha_1\downarrow$	2/1	3/3	2/0	4/4	0/0	0/1	12/8*	0/1*	1/1*	1/0
$\alpha_2\uparrow/\alpha_2\downarrow$	3/0	6/0	2/0	8/2	1/0	2/0	19/3*	3/0*	2/0*	1/0
$\beta_1-2\uparrow/\beta_1-2\downarrow$	3/0	4/0	0/0	3/0	1/0	1/0	10/1*	2/0*	1/0*	0/1
$\beta_3\uparrow/\beta_3\downarrow$	4/0	5/1	0/0	9/1	0/0	2/0	19/3	2/0*	1/0	0/0
$\gamma\uparrow/\gamma\downarrow$	2/0	2/0	0/0	3/0	0/1	1/0	8/1	1/2	2/0	0/1

$n < A/G$, število psov z znižanim razmerjem med albumini in globulini; KS, kontrolna skupina;; G, globulini; α_1 - γ , frakcije globulinov; \uparrow , zvišano; \downarrow , znižano; * statistično značilno od kontrolne skupine

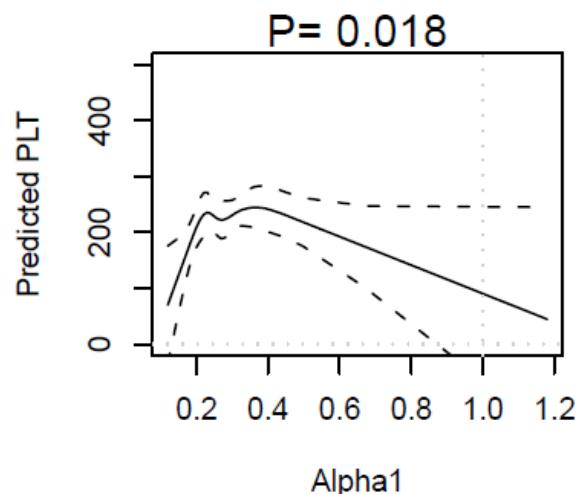
V primerjavi razmerja A/G vseh vzorcev s kontrolno skupino ni bilo statistično značilnih razlik. Nadalje smo s kontrolno skupino statistično primerjali posamezne frakcije proteinov zgolj pri vzorcih, ki so imeli patološko razmerje A/G in našli naslednje razlike: albumini so bili statistično značilno nižji v skupinah z IFA titri $\leq 1:1024$ in PCR pozitivnih. Globulini so bili statistično značilno višji v skupinah z IFA titri $\leq 1:1024$ in $\geq 1:2048$. α_1 globulini so bili statistično značilno nižji v skupinah z IFA titri $\leq 1:1024$ in $\geq 1:2048$ ter PCR pozitivnih, α_2 in β_1-2 globulini pa višji. β_3 globulini so bili statistično značilno višji zgolj v skupini z IFA titri $\geq 1:2048$, medtem ko γ globulini v nobeni skupini niso statistično značilno odstopali.

Ugotavljalci smo tudi povezavo med posameznimi frakcijami proteinov in trombocitopenijo (Graf 8, 9, 10). Trombocitopenija se pojavi v akutni fazi anaplazmoze, čemur so odgovarjale frakcije proteinov; ugotovili smo našli statistično značilno povezavo med trombocitopenijo in hipoalbuminemijo, hipo- α_1 -globulinemijo in hipergamoglobulinemijo.



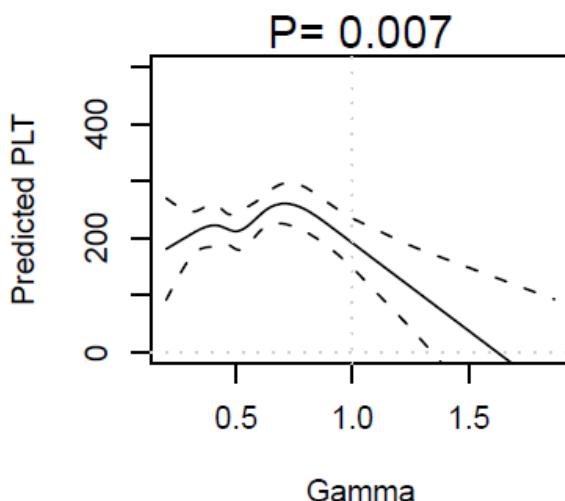
Graf 8: Statistično značilna povezava med hipoalbuminemijo in trombocitopenijo

Psi s hipoalbuminemijo imajo statistično značilno nižjo vrednost trombocitov.



Graf 9: Statistično značilna povezava med hipo- α 1-globulinemijo in trombocitopenijo

Psi s hipo- α 1-globulinemijo imajo statistično značilno nižjo vrednost trombocitov.



Graf 10: Statistično značilna povezava med hipergamaglobulinemijo in trombocitopenijo

Psi s hipergamaglobulinemijo imajo statistično značilno nižjo vrednost trombocitov.

4.2.4 Ugotavljanje cirkulirajočih imunskih kompleksov v krvi

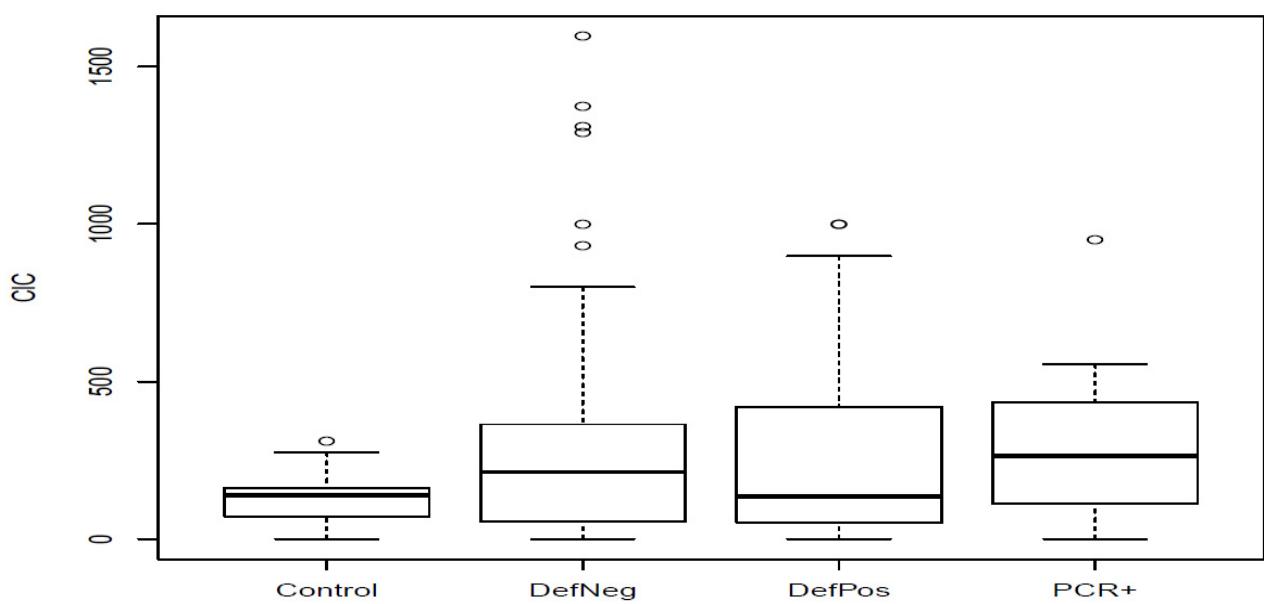
CIC-e smo ugotavljali pri 223-ih vzorcih, in sicer pri 31-ih iz skupin 1:128 in 1:512, 26-ih iz skupine 1:256, 34-ih iz skupin 1:1024 in > 1:2048, 24-ih iz skupine 1:2048, 24-ih PCR pozitivnih vzorcih in 19-ih iz kontrolne skupine. Dokazali smo jih skupno pri 180-ih (80,7 %) vzorcih, in sicer pri 22-ih (70,9 %) vzorcih iz skupine 1:128, 23-ih (88,5 %) iz skupine 1:256, 28-ih (90,3 %) iz skupine 1:512, 24-ih (70,6 %) iz skupine 1:1024, 20-ih (83,3 %) iz skupine 1:2048, 26-ih (76,5 %) iz skupine > 1:2048, 20-ih (83,3 %) PCR pozitivnih in 17-ih (89,5 %) vzorcih iz kontrolne skupine (Tabela 10).

Tabela 10: Rezultati ugotavljanja CIC-ov ($\mu\text{g/ml}$), (povprečje \pm standardna deviacija) pri skupinah z različnimi IFA titri, PCR + in kontrolni skupini

	vsi titri <i>n</i>	IFA titer						PCR	KS
		1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	> 1:2048		
	180	31	26	31	34	24	34	24	19
CIC	271,5	221,4	375,3	274,2	250,8	276,2	252,7	290,9	127,3
\pm SD	298,4	185,0	380,1	287,9	334,1	282,8	296,8	230,2	84,5

n, število vzorcev; KS, kontrolna skupina; CIC, cirkulirajoči imunski kompleksi; SD, standardna deviacija

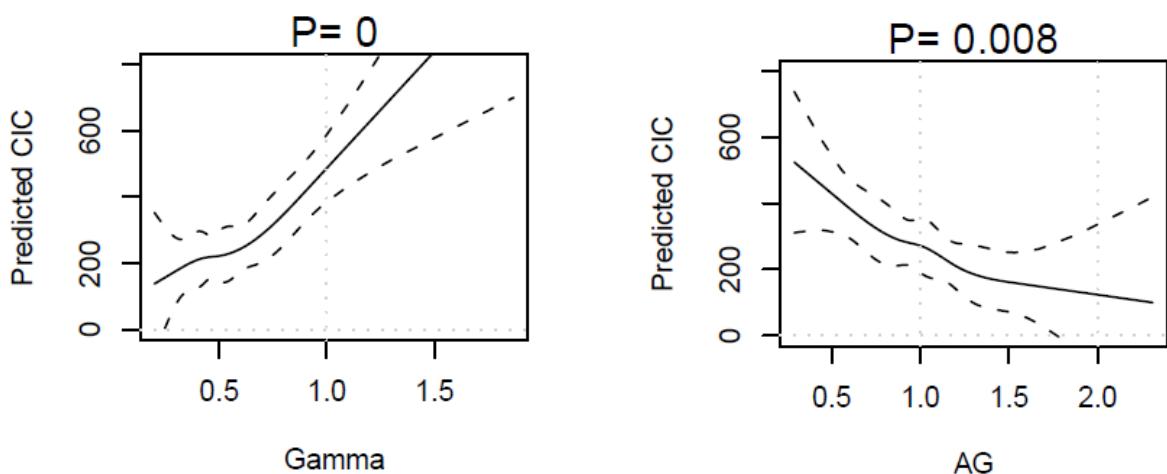
Čeprav so imeli IFA in PCR pozitivni psi koncentracijo CIC-ov v povprečju višjo za 151,3 $\mu\text{g/ml}$, pa razlike med skupinami niso bile statistično značilne (Graf 11).



Control, kontrolna skupina; DefNeg, IFA titri $\leq 1:1024$; DefPos, IFA titri $\geq 1:2048$

Graf 11: Primerjava koncentracije CIC-ov med posameznimi skupinami

Statistično značilne povezave smo ugotovili med koncentracijo CIC-ov in trombocitopenijo – psi z višjo koncentracijo CIC-ov so imeli statistično značilno nižje trombocite ($P < 0,05$). Ravno tako smo ugotovili povezavo med koncentracijo CIC-ov in hipergamaglobulinemijo ter znižanim razmerjem A/G – psi z višjo koncentracijo CIC-ov so imeli statistično značilno višje γ globuline in nižji A/G (Graf 12a, b).



Graf 12a in b: Statistično značilna povezava med koncentracijo CIC-ov in γ globulinov ter razmerjem A/G

4.2.5 Ugotavljanje prisotnosti in vrste proteinurije

4.2.5.1 Urinogram

Analizo urina smo opravili s testnim trakom in s pregledom urinskega sedimenta pod mikroskopom. Skupno smo urinogram opravili pri 35-ih psih, od tega pri treh z IFA titrom 1:128, dveh z IFA titrom 1:256, petih z IFA titrom 1:512, osmih z IFA titrom 1:1024, desetih z IFA titrom 1:2048, osmih z IFA titrom > 1:2048 in treh PCR pozitivnih psih.

S testnim trakom v nobeni skupini nismo odkrili pomembnejših odstopanj z izjemo nekaj vrednosti specifične teže (SG) izven referenčnih meja. V skupini 1:128 je imel en vzorec previsoko SG, v skupini 1:256 dva vzorca previsoko SG, v skupini 1:512 en vzorec previsoko in dva prenizko SG, v skupini 1:1024 dva vzorca previsoko SG, v skupini 1:2048 en vzorec prenizko in štirje previsoko SG, v skupini > 1:2048 dva vzorca previsoko in dva prenizko SG in v PCR pozitivni skupini dva vzorca previsoko SG. Ker gre zgolj za enkratno meritev SG v naključnem vzorcu urina in ker z izjemo dveh vzorcev s prenizko SG ostali ne korelirajo s patološkim urinskim sedimentom ali prisotnostjo proteinurije, sprememba SG urina ni nujno patološki rezultat. Za oceno pomena spremenjene SG urina je potreben pregled SG v vsaj treh zaporednih vzorcih urina, zbranih v istem dnevnu.

Pri pregledu urinskega sedimenta smo se osredotočili predvsem na pojav cilindrov in malih okroglih celic v urinu, ki nakazujejo na poškodbe ledvic. V desetih vzorcih je bil urinski sediment neaktivni, v šestih so prevladovale ploščate in okrogle epitelne celice, ki izhajajo iz spodnjega urinarnega trakta, v sedmih vzorcih so bile poleg epitelnih prisotne še vnetne celice in bakterije, kar nakazuje na uroinfekt. V 12-ih vzorcih pa so bili prisotni hialini in drobnogranulirani cilindri, in sicer v skupinah 1:128 in 1:256 v enim vzorcu, v skupini 1:512 v dveh vzorcih, v skupinah 1:1024 in 1:2048 v treh vzorcih in v skupini > 1:2048 v enim vzorcu. V vseh treh PCR pozitivnih vzorcih je bil urinski sediment neaktivni. V sedmih vzorcih, v katerih so bili prisotni cilindri, je bil povišan tudi UPC, elektroforeza pa je pokazala nefiziološko prisotnost proteinov v urinu (Tabela 11).

Tabela 11: Rezultati preiskav pri vzorcih urina s cilindri v sedimentu

IFA titer	cilindri	UPC (< 0,5)	elektroforeza proteinov
1:128	hi, dg	1,056	MMW, HMW
1:256	hi, dg	1,590	LMW, MMW, HMW
1:512	hi, dg, rc	1,171	LMW, MMW, HMW
1:1024	hi, dg, rc	1,690	LMW, MMW, HMW
1:2048	dg	2,009	LMW
1:2048	hi, dg	23,45	LMW, MMW, HMW
1:2048	hi, dg	0,7670	LMW, MMW, HMW

hi, hialini cilindri; dg, drobnogranulirani cilindri; rc, renalne celice; LMW, nizkomolekularni proteini (< 66 kDa); MMW, srednjemolekularni proteini (66–76 kDa); HMW, visokomolekularni proteini (> 76 kDa)

4.2.5.2 Razmerje med proteini in kreatininom v urinu

UPC smo izmerili v 36-ih vzorcih. V 11-ih vzorcih je bil višji od referenčne meje, in sicer v enem vzorcu v skupinah 1:128, 1:256, 1:1024 in > 1:2048, v treh vzorcih v skupini 1:512 in v štirih vzorcih v skupini 1:2048. V vseh vzorcih, v katerih je bil UPC povišan, smo z elektroforezo zaznali prisotnost srednje- in visokomolekularnih proteinov, z izjemo enega vzorca v skupini 1:2048, kjer so bili prisotni samo nizkomolekularni proteini, ki so lahko tudi fiziološki (Tabela 11). Pri treh vzorcih s povišanim UPC elektroforeze urinskih proteinov nismo izvedli.

4.2.5.3 Elektroforeza urinskih proteinov

Elektroforezo urinskih proteinov smo izvedli pri 62-ih vzorcih, od tega pri treh iz skupine 1:128, dveh iz skupine 1:256, sedmih iz skupine 1:512, devetih iz skupine 1:1024, 14-ih iz skupine 1:2048, sedmih iz skupine > 1:2048, treh PCR pozitivnih in 17-ih iz kontrolne skupine. Proteine z različno molekulsko težo smo dokazali v 36-ih vzorcih (58,1%), v 26-ih vzorcih proteini niso bili prisotni (Tabela 12). Proteine smo razdelili v tri skupine glede na molekulsko težo, in sicer v nizkomolekularne LMW (< 66 kDa), srednjemolekularne MMW (66–76 kDa) in visokomolekularne HMW (> 76 kDa). Na tej osnovi razdelimo proteinurijo v tubularno (ko so prisotni samo LMW) in tubuloglomerularno (ko so prisotni LMW in MMW ali HMW). V kontrolni skupini smo pri desetih psih dokazali prisotnost LMW, in sicer osem

lis na področju 25 kDa, pet na 10 kDa, dveh na 55 kDa in enem na 15 kDa. Vsi psi v kontrolni skupini so bili klinično zdravi in so imeli UPC znotraj referenčnih vrednosti. Prisotnost LMW v urinu je lahko fiziološka, predvsem v urinu zdravih psov dostikrat najdemo albumine (66 kDa). Lahko pa je indikator tubularne proteinurije ali celo glomerularne, saj so Perini in sodelavci (1987) v področju od 10–70 kDa našli razgradne produkte imunoglobulinov. Pri psih v naši raziskavi, ki so imeli UPC znotraj referenčnih vrednosti, so bile v šestih vzorcih prisotne lise na 25 kDa, v petih vzorcih lise na 55 kDa, v dveh vzorcih na 10 in v enem vzorcu na 15 kDa. Psi v kontrolni skupini so imeli lise na povsem enakih molekulskih težah, zato smo lise na 10, 15, 25 in 55 kDa šteli za fiziološke. Vsi psi, pri katerih smo zaznali prisotnost LMW, so imeli UPC znotraj referenčnih vrednosti in lise na 10, 15, 25 ali 55 kDa, zato lahko sklepamo, da pri nobenem od pregledanih psov nismo zaznali tubularne proteinurije.

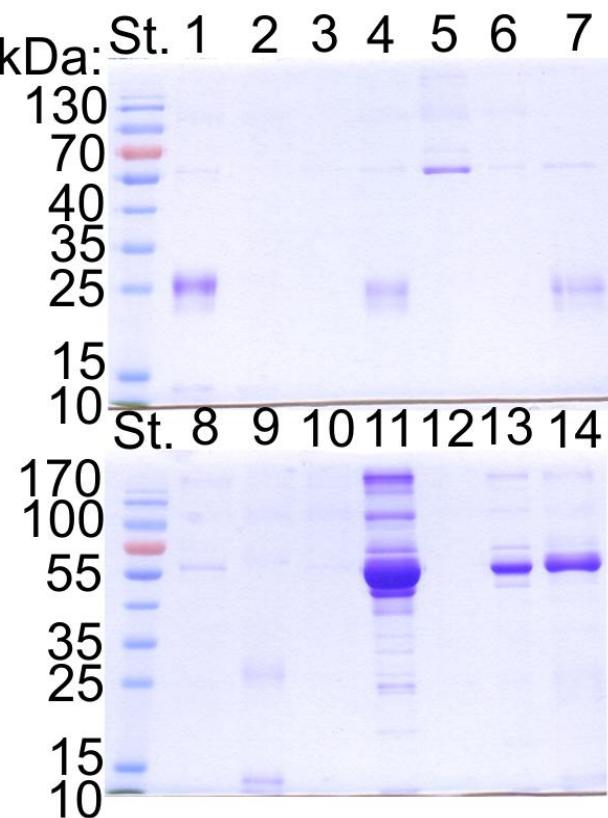
Prisotnost LMW, MMW in HMW smo dokazali pri 11-ih vzorcih, in sicer pri enem v skupinah 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 in > 1:2048 ter MMW in HMW pri enem vzorcu iz skupine 1:1024. V vseh teh vzorcih je bil UPC nad referenčno vrednostjo z izjemo enega vzorca z LMW, MMW in HMW v skupini 1:1024. Za te pse lahko sklepamo, da imajo tubuloglomerularno proteinurijo.

V enem vzorcu iz skupin 1:128 in 1:256, treh vzorcih iz skupin 1:512, 1:2048 in > 1:2048 in petih vzorcih iz skupine 1:1024 nismo zaznali proteinurije. Prav tako proteinurije ni bilo v treh vzorcih iz PCR pozitivne skupine.

Tabela 12: Rezultati elektroforeze urinskih proteinov

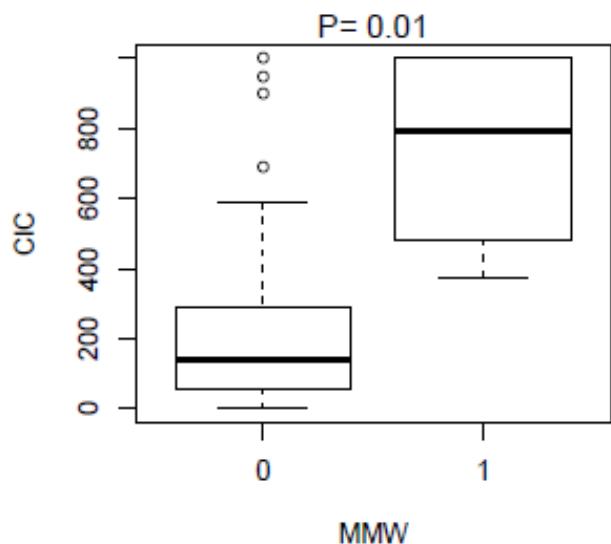
vzorec	UPC	LMW	MMW	HMW
1:128	0,136	+	-	-
1:128	1,056	+	+	+
1:256	1,590	+	+	+
1:512	NP	+	-	-
1:512	0,470	+	-	-
1:512	1,171	+	+	+
1:512	0,360	+	-	-
1:1024	0,271	+	+	+
1:1024	1,690	-	+	+
1:1024	0,177	+	-	-
1:1024	0,345	+	-	-
1:2048	2,900	+	+	+
1:2048	23,450	+	+	+
1:2048	0,630	+	+	+
1:2048	0,190	+	-	-
1:2048	0,140	+	-	-
1:2048	0,170	+	-	-
1:2048	NP	+	-	-
1:2048	2,009	+	+	+
1:2048	NP	+	+	+
1:2048	0,767	+	+	+
1:2048	0,310	+	-	-
>1:2048	0,284	+	-	-
>1:2048	NP	+	+	+
>1:2048	0,207	+	-	-
>1:2048	0,282	-	-	-

NP, ni podatka; +, pozitiven; -, negativen; UPC, razmerje med proteini in kreatininom v urinu (referenčna vrednost < 0,5); LMW, nizkomolekularni proteini (< 66 kDa); MMW, srednjemolekularni proteini (66 – 76 kDa); HMW, visokomolekularni proteini (> 76 kDa)



Slika 4: Elektroforeza urinskih proteinov. V vzorcih številka 1, 4, 5, 7, 9, 13 in 14 so prisotni LMW proteini (molekulska teža 25 kDa in 55 kDa), ki jih štejemo za fiziološke. V vzorcu številka 11 so prisotni LMW, MMW in HMW, ki nakazujejo na neselektivno tubuloglomerularno proteinurijo.

Ugotovili smo tudi statistično značilno povezavo med koncentracijo CIC-ov in prisotnostjo MMW in HMW v urinu ($P = 0,01$), in sicer z naraščanjem koncentracije CIC-ov narašča pojavnost proteinurije (Graf 13).



Graf 13: Statistično značilna povezava med koncentracijo CIC-ov in prisotnostjo MMW

5 DISKUSIJA

5.1 Retrospektivna študija

5.1.1 Pogostost okužbe z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum*

Bakterijo *A. phagocytophilum* v Evropi primarno prenašajo klopi vrste *I. ricinus*. V zadnjih 20–30-ih letih se je njihov habitat zaradi podnebnih sprememb razširil in zajel praktično celo Evropo (Gray, 1991; Jaenson in sod., 1994). Vse večja populacija klopor živi tudi v urbanem okolju in ni več omejena zgolj na gozdove. K temu prispeva tudi naraščajoča populacija psov in mačk v urbanem okolju, ki omogočajo preživetje klopor, in gradnja bivališč na obrobju, blizu naravnega okolja *I. ricinus* (Dautel in Kahl, 1999). *I. ricinus* je najpomembnejša vrsta klopa v Evropi, ki poleg bakterije *A. phagocytophilum* prenaša še vsaj pet serovarov bakterije *B. burgdorferi s.l.* (Hubálek in Halouzka, 1997; Kurtenbach in sod., 1999), virus klopnega meningoencefalitisa (Nuttall in Labuda, 1994) in parazita *Babesia divergens* (Gray, 1991). Zato so se skupaj z razširjenostjo klopa razširile tudi bolezni, ki jih povzročajo omenjeni mikroorganizmi. Seroprevalenca anaplazmoze pri psih v Evropi je 50-odstotna (Barutzki in sod., 2006). Raziskava je bila opravljena pri 1124 psih, sumljivih na anaplazmozo. V naši študiji ugotavljamo višjo pogostost okužbe (73,8 %), kar je v skladu z rezultati iz humane medicine, kjer prvi dokazan primer akutne humane granulocitne anaplazmoze v Evropi pa tudi poročila o najpogostejših okužbah (Petrovec in sod., 1997; Strle, 2004; Lotrič-Furlan in sod., 2006) in najvišji seroprevalenci pri ljudeh (Čižman in sod., 2000) izvirajo prav iz Slovenije. To nakazuje na možnost, da sta v Sloveniji infestacija z okuženimi klopi *I. ricinus* in izpostavljenost ljudi in psov klopor zaradi okolja in načina življenja med najvišjimi.

5.1.2 Indirektni imunofluorescenčni test in PCR

Od 749-ih skupno pregledanih psov smo okužbo potrdili pri 553-ih (73,8 %) psih, od tega pri 547-ih (98,9 %) serološko, pri 29-ih (5,1 %) pa smo dokazali povzročitelja s PCR. Nizek odstotek PCR pozitivnih psov je odraz kratkotrajnega obdobja bakteriemije, ki se pri anaplazmozi pojavi znotraj dveh tednov po okužbi in traja štiri do devet dni (Egenvall in sod., 2000). Pri naravno okuženih psih to obdobje največkrat zamudimo, saj jih lastniki pripeljejo k veterinarju nekaj dni po pojavu akutnih kliničnih znakov, kar predstavlja dodatno oviro pri postavitvi diagnoze in odločjanju glede zdravljenja. Porazdelitev psov glede na titer specifičnih protiteles z IFA je bila v naši raziskavi dokaj enakomerna. Ker ob PCR

negativnem rezultatu ne vemo, v kateri fazi bolezni je bil odvzet vzorec krvi, zgolj na podlagi IFA titra ne moremo sprejemati odločitve glede zdravljenja in napovedati nadaljnjega poteka bolezni.

5.1.3 Demografski podatki

Razlike med spoloma so bile v naši raziskavi minimalne – samci so nekoliko številčneje zastopani (56,4 %) od samic (43,6 %). Podobno zastopanost med spoloma opisujeta tudi Harrus in Waner (2005) za primer okužbe z bakterijo *E. canis*. Nasprotno pa v pasemske porazdelitvi pri okužbi z bakterijo *E. canis* opisujeta večjo dovetnost nemških ovčarjev za okužbo kot tudi resnejši potek bolezni pri psih te pasme (Harrus in Waner, 2005). V naši raziskavi so bili nemški ovčarji na drugem mestu po zastopanosti, največ je bilo zlatih prinašalcev, labradorcev, bernskih planšarskih psov in koker španjelov. Pri njih nismo opazili razlik v poteku bolezni. Pasemska porazdelitev v naši raziskavi je bolj verjetno odsev najbolj priljubljenih pasem v Sloveniji kot pa pokazatelj povečane dovetnosti za okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum* pri omenjenih pasmah. Omenjene pasme spadajo med srednje do velike pasme psov. Kot razlog za pogostejšo okužbo velikih psov Egenvallova in sodelavci (1997) navajajo njihovo večjo izpostavljenost klopm zaradi večje telesne površine in aktivnega življenskega sloga. Povprečna starost psov v naši raziskavi je bila 5,7 let (0,5–16 let). Vsaj deset psov je bilo mlajših od enega leta, najmlajši je bil star šest mesecev. To je v nasprotju z raziskavo, opravljeno na Švedskem, kjer je bil najmlajši pes star 1,5 let, kar raziskovalci pojasnjujejo s tem, da se klinična slika bolezni razvije po ponavljanjih izpostavitvah bakteriji *A. phagocytophilum* oziroma pri psih z dokončno razvitim in aktiviranim imunskim sistemom (Egenvall in sod., 1997). Rezultati naše raziskave kažejo, da lahko tudi zelo mlad pes razvije klinične znake bolezni, kar je lahko podobno kot pri okužbi z bakterijo *B. burgdorferi s.l.*. Hovius (2005) namreč opisuje, da odrasel pes potrebuje večkratno okužbo z bakterijo *B. burgdorferi s.l.* za razvoj klinično zaznavne bolezni, vendar so v eksperimentalni okužbi uspeli izzvati bolezen pri zelo mladih psih. Z enkratno izpostavitvijo povzročitelju so okužili dva do šest tednov stare pse, ki so dva do pet mesecev po okužbi razvili klinične znake bolezni (Hovius, 2005).

5.1.4 Pojavnost kliničnih znakov

Najpogostejši klinični znaki v naši raziskavi so bili znaki akutnega infekcijskega sindroma s povišano telesno temperaturo, letargijo in anoreksijo. Ti znaki so bili najizrazitejši v PCR

pozitivni skupini (54,8 %) in v skupinah z najvišjimi IFA titri (51,4 %), ki nakazujejo na akutno fazo bolezni, vendar so se v nasprotju z opisanim v visokem odstotku pojavili tudi v skupinah z nižjimi IFA titri. Drugi najpogosteji klinični znak v vseh skupinah je bilo šepanje, ki je tipična kronična manifestacija anaplazmoze (Egenvall in sod., 2000). V naši raziskavi je bilo šepanje pogosto tudi v PCR pozitivni skupini (35,5 %) in v skupinah z najvišjimi IFA titri (55,5 in 64,9 %). V nasprotju z nekaterimi raziskavami (Björsdorff, 2005; Egenvall in sod., 1997; Egenvall in sod., 2000) smo ugotovili relativno pogosto pojavljanje hujših kliničnih znakov pri psih z nižjimi IFA titri (28,6 %) in redko pojavljanje psov s pozitivnim IFA brez kliničnih znakov. To nakazuje na možnost, da subklinične okužbe niso tako pogoste, kot jih opisuje literatura (Björsdorff, 2005). Naši rezultati kažejo tudi, da višine IFA titra ne moremo neposredno povezati s pojavnostjo kliničnih znakov, čeprav je možno, da vsi klinični znaki pri seropozitivnih psih niso bili odraz anaplazmoze. O tem lahko sklepamo predvsem na podlagi dejstva, da se je pri psih z nižjimi IFA titri ($\leq 1:1024$) pojavil širši spekter kliničnih znakov kot pri tistih z višjimi titri ($\geq 1:2048$) in PCR pozitivnim rezultatom, ki so v akutni fazi bolezni. Statistično značilne razlike smo ugotovili pri kliničnih znakih akutnega infekcijskega sindroma in šepanju. Te znaake tudi literatura najpogosteje povezuje z anaplazmozo, in sicer se letargija, anoreksija in povišana telesna temperatura pojavijo v akutni, šepanje pa pogosteje v kronični fazi bolezni. Znaki akutnega infekcijskega sindroma v naši raziskavi so v skladu s tem statistično značilno prevladovali pri PCR pozitivnih psih v primerjavi z IFA pozitivnimi, medtem ko je šepanje prevladovalo pri psih z IFA titri $\geq 1:2048$ v primerjavi s PCR pozitivnimi in nižjimi IFA titri.

5.1.5 Hematološke in biokemijske spremembe

Najočitnejša hematološka sprememba v vseh skupinah z izjemo skupine z najvišjim IFA titrom ($> 1:2048$) je bila trombocitopenija, ki je bila najizrazitejša v fazi bakteriemije. Trombocitopenija se najpogosteje pojavlja tudi pri monocitni erlihiozi psov (Harrus in Waner, 2005). Patogeneza trombocitopenije pri obeh bolezni je slabo raziskana; pripisujejo jo več imunološkim in neimunološkim mehanizmom (Harrus in sod., 1996; Waner in sod., 1995). Trombociti se običajno vrnejo v referenčne vrednosti nekaj dni po bakteriemiji (Lilliehöök in sod., 1998; Harrus in Waner, 2005). Rezultati naše raziskave sovpadajo s tem, saj je bila edina skupina, pri kateri nismo ugotovili trombocitopenije, skupina z najvišjim IFA titrom ($> 1:2048$), za katerega sklepamo, da je akutni titer, ki sledi fazi bakteriemije. To domnevno potrjuje tudi visoka pojavnost akutnih kliničnih znakov v tej skupini, ki je primerljiva s

skupino s pozitivnim PCR, in presega pojavnost akutnih kliničnih znakov v drugih skupinah s pozitivnim IFA rezultatom. Predlagana imunološka mehanizma za razvoj trombocitopenije v tej fazi bolezni sta produkcija IFN- γ (ki preneha kmalu po pojavu specifičnih protiteles) (Dumler, 2008) in produkcija protiteles proti trombocitom, ki so jih dokazali v akutni fazi monocitne erlihioze (Waner in sod., 2000). Interpretacija trombocitopenije v drugih IFA skupinah je manj zanesljiva, ker ne vemo, v kateri fazi bolezni so bili psi. Mediane vrednosti trombocitov so rasle z naraščanjem IFA titra, kar lahko pojasnimo z opisanimi mehanizmi v primeru naraščanja titra protiteles, ki sledi fazi bakteriemije. Toda IFA titri so lahko različno visoki ali ostajajo celo zelo visoki mesece po okužbi ali v primeru perzistentne okužbe (Egenvall in sod., 2000). Vrednosti trombocitov so bile statistično značilno nižje v vseh skupinah (IFA \leq 1:1024, \geq 1:2048 in PCR pozitivni) v primerjavi s kontrolno skupino. Prav tako so imeli psi s pozitivnim PCR statistično značilno nižje trombocite od tistih s pozitivnim IFA. To potrjuje najizrazitejšo trombocitopenijo v fazi bakteriemije. Rezultati naše raziskave kažejo, da ne glede na višino IFA titra klinične znake anaplazmoze skoraj vedno spremlja trombocitopenija. Nasprotno pa psi z različnimi, tudi visokimi IFA titri, ki ne kažejo kliničnih znakov anaplazmoze, običajno niso trombocitopenični. Povezava trombocitopenije in tipičnih kliničnih znakov v prisotnosti nizkih IFA titrov podpira predlagan odvzem parnih serumov v razmaku vsaj 4-ih tednov, kar predvidevajo tudi trenutno veljavni kriteriji za akutno anaplazmozo (Björsdorff, 2005). Nadalje ti rezultati poudarijo, da serološko pozitiven rezultat, tudi v visokih IFA titrih, ki ga ne spremljajo tipični klinični znaki in/ali trombocitopenija, ne opravičuje zdravljenja s specifičnimi antibiotiki.

Mediane vrednosti drugih hematoloških parametrov so ostale znotraj referenčnih vrednosti, čeprav so se pojavile nekatere statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino. Nekateri avtorji navajajo anemijo (zmerno do hudo), levkopenijo z limfo- in nevtropenijo, ki ji sledi levkocitoza z limfocitozo (zmerno do hudo) (Tozon in Petrovec, 2002; Lepidi in sod., 2000; Lilliehöök in sod., 1998). Mediane vrednosti hematokrita in RBC so bile nižje v vseh skupinah v primerjavi s kontrolno skupino, vendar so ostale znotraj referenčnih vrednosti. Naša raziskava torej ne potrjuje anemije, ki je v drugih raziskavah druga najpogostejsa za trombocitopenijo, kot hematološko spremembo pri anaplazmozi, kar sovpada z rezultati Björsdorffove (2005).

Vrednosti WBC in diferencialne bele krvne slike so zelo variirale in kot take ne morejo biti uporabne kot marker poteka bolezni. Celo v PCR pozitivni skupini, pri kateri lahko določimo fazo bolezni, niso bile primerljive z objavljenimi rezultati eksperimentalne okužbe psov v isti fazi bolezni (Egenvall in sod., 2000). Tako na podlagi naših rezultatov ne moremo potrditi levkopenije, ki ji sledi levkocitoza, kot pomembnejše hematološke spremembe pri okužbi z bakterijo *A. phagocytophilum*.

Edina biokemijska sprememba v naši raziskavi je bilo zmerno povišanje aktivnosti AP pri seropozitivnih psih. Povišana aktivnost AP je pogosta pri psih z anaplastozo (Björsdorff, 2005; Greig in sod., 1996). Ostalih korelacij med biokemijskimi parametri zaradi zelo omejenega števila vzorcev v posamezni skupini (maksimalno pet vzorcev) nismo mogli statistično primerjati.

5.1.6 Sočasna okužba z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato

A. phagocytophilum in *B. burgdorferi s.l.* si delita tako vektorje kot rezervoarje, prav tako prisotnost enega povzročitelja v klopu ne vpliva na okužbo z drugim povzročiteljem iz okuženega gostitelja (Björsdorff, 2005), zato ni presenetljivo, da pri psih pogosto ugotavljamo sočasno okužbo z obema povzročiteljema. V naši raziskavi smo pri 113-ih preiskanih psih sočasno okužbo dokazali v 30,1 % primerov. Raziskave kažejo, da je v Evropi z bakterijama *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi s.l.* sočasno okuženih 8,3 % (Stańczak in sod., 2004) oziroma 6,1 % (Hildebrandt in sod., 2003) klopor *I. ricinus*. Sočasno okužbo z omenjenima povzročiteljema so dokazali pri 25 % psov v ZDA (Beall in sod., 2008), natančnejših poročil o sočasni okužbi pri psih v Evropi nismo zasledili. Glede na relativno nizek odstotek sočasno okuženih klopor v primerjavi s sočasno okuženimi psi je verjetneje, da k sočasni okužbi večji delež doprinese okužba z več klopi, okuženimi z enim povzročiteljem, kot okužba s klopi, ki so nosilci obeh povzročiteljev hkrati.

5.2 Prospektivna študija

5.2.1 Določanje aminokislinskega in nukleotidnega zaporedja - sekveniranje

V svetu je opisanih pet genetskih različic bakterije *A. phagocytophilum*, ki se pojavljajo pri psih. Razlike v patogenosti med njimi so slabo raziskane. V Sloveniji sta do danes identificirani dve različici, ena se pojavlja pri človeku in psu (H), druga zgolj pri psu (P). Z našo raziskavo smo ugotovili statistično značilno razliko v pojavu znakov akutne bolezni, kjer

prevladuje različica H, pri pojavnosti drugih kliničnih znakov med njima ni razlik. To kaže, da sta obe genetski različici bakterije *A. phagocytophilum*, ki se pojavljata v Sloveniji, patogeni za pse, lahko pa je pri okužbi z eno ali drugo potek bolezni različen. Pri različici P je tudi več psov ostalo asimptomatskih, vendar razlike niso bile statistično značilne. Smiselno bi bilo nadaljnje spremljanje razlik med obema različicama in ugotavljanje, ali nam lahko identifikacija genetske različice služi kot napovedni dejavnik za potek in izid bolezni.

5.2.2 Elektroforeza serumskih proteinov

Indikacija za izvedbo elektroforeze serumskih proteinov (SPE) je prisotnost bolezni, ki povzroči disproteinemijo. Pri psih obstajajo poročila o vzorcih SPE pri boleznih jeter (Sevelius in Andersson, 1995), neoplazijah (Gavazza in Sacchini, 2009), endokrinih (Vaden in sod., 2009) in infekcijskih boleznih (Harrus in sod., 1996; Ciaramella in sod., 1997). Za monocitno erlihiozo in leishmaniozo, ki lahko potekata v kronični obliki, avtorji opisujejo hipoalbuminemijo, hiperglobulinemijo, predvsem hipergamaglobulinemijo, in hipo- α 1-globulinemijo. Hipoalbuminemija, ki je prisotna v vseh fazah monocitne erlihioze, je najverjetnejše posledica anoreksije in zmanjšanega vnosa proteinov, izgube krvi, periferne izgube tekočin zaradi vaskulitisa (Woody in Hoskins, 1991), znižane produkcije albuminov zaradi sočasne bolezni jeter (Reardon in Pierce, 1981) ali proteinurije. K hiperglobulinemiji največ prispevajo γ globulini, ki narastejo v febrilni fazi bolezni in vztrajajo v subklinični in kronični fazi. V naši raziskavi disproteinemija, ki poruši razmerje med A/G, ni bila statistično značilna v nobeni skupini, tudi v akutni fazi, ki jo karakterizira PCR pozitiven rezultat, ne. Znižano razmerje med A/G smo ugotovili pri 32-ih vzorcih, večino (84,4 %) od teh v skupinah z IFA titri \leq 1:1024, torej skupinah, ki po trenutno veljavnih kriterijih (Björsdorff, 2005) ne spadajo v akutno anaplastozo. Odstopanja posameznih frakcij proteinov so sovpadala z opisanimi pri monocitni erlihiozi in leishmaniozi z razliko pri γ globulinih, ki se statistično značilno niso razlikovali od kontrolne skupine. Hipergamaglobulinemija je sicer najznačilnejše odstopanje v elektroforetogramu pri infekcijskih boleznih z disproteinemijo. V naši raziskavi so k hiperglobulinemiji največ prispevali α 2 in β 1-2 globulini, kamor spadajo proteini akutne faze. Klinični znaki, ki so prevladovali pri psih z znižanim razmerjem med A/G, so bili v 72,7 % primerov znaki akutnega infekcijskega sindroma, prav tako je bilo 61 % psov trombocitopeničnih. To lahko nakazuje na to, da tudi psi, ki imajo nižje IFA titre in so subklinično ali perzistentno okuženi, v določenem trenutku razvijejo akutno obliko anaplastoze. Druga možnost pa je, da je k disproteinemiji pripomoglo drugo bolezensko

stanje in je bil pozitiven IFA titer proti bakteriji *A. phagocytophilum* naključno odkrit v diagnostičnem postopku. Glede na to, da ni bilo statistično značilne razlike v nobeni izmed preiskovanih skupin v primerjavi s kontrolno skupino in da tudi pri vzorcih z disproteinemijo nismo dokazali hipergamaglobulinemije, ne moremo priporočiti elektroforeze serumskih proteinov kot diagnostične metode, ki bi prispevala k razumevanju poteka bolezni. Na podlagi statistično značilne povezave med trombocitopenijo in frakcijami proteinov, ki so značilni za akutno fazo bolezni, pa lahko poudarimo pomen trombocitopenije. Kadar ta spremišča klinične znake, je zdravljenje ne glede na višino titra utemeljeno.

5.2.3 Cirkulirajoči imunski kompleksi

Prisotnost CIC-ov je opisana pri mnogih infekcijskih boleznih, z njimi povzročena bolezenska odstopanja, kot so glomerulonefritis, poliartritis in uveitis pa se pojavi, ko bolezen preide v kronično fazo (Pedersen, 1999). Pri okužbi z bakterijo *E. canis* so CIC-e dokazali tako pri naravno kot eksperimentalno okuženih psih v akutni in subklinični fazi bolezni (Harrus in sod., 2001). Rezultati njihove raziskave kažejo, da je pri psih, pri katerih so dokazali prisotnost CIC-ov, bolezen potekala v težji obliki kot pri tistih, ki niso imeli CIC-ov v serumu. V naši raziskavi je bila koncentracija CIC-ov povezana s trombocitopenijo, hipergamaglobulinemijo in nižjim razmerjem A/G. Statistično značilno ($P < 0,05$) je bila koncentracija CIC-ov višja pri psih s trombocitopenijo neodvisno od višine IFA titra in rezultata PCR. To potrjuje domnevo, da je trombocitopenija povezana z imunskimi mehanizmi. Pozitivna korelacija med koncentracijo CIC-ov in nižjim razmerjem A/G ter hipergamaglobulinemijo to domnevo še dodatno okrepi. Statistično značilne povezave med koncentracijo CIC-ov in kliničnimi znaki sicer nismo našli, vendar se je pri psih, ki so imeli nizko koncentracijo CIC-ov, pojavilo šepanje v 48,7 %, kar zmanjšuje verjetnost nastanka artritisa kot posledice odlaganja imunskih kompleksov v sklepu. Za potrditev te domneve bi bil v nadaljevanju potreben odvzem sinovialne tekočine za dokaz prisotnosti imunskih kompleksov ali imunohistokemični dokaz specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum* na sinovialni membrani in/ali v sinovialni tekočini.

Dokazali smo statistično značilno korelacijo med koncentracijo CIC-ov in proteinurijo. Proteinurija je bila ugotovljena pri psih z visoko koncentracijo CIC-ov. Vendar je bilo število vzorcev v tej raziskavi zelo majhno (štirje vzorci), zato bi bilo potrebno povečati njihovo število in rezultate dopolniti s histološko preiskavo ledvičnega tkiva in potrditev njihovega

razvoja z imunohistokemičnimi barvanji. Če bi tudi na večjem številu vzorcev dokazali korelacijo med koncentracijo CIC-ov in proteinurijo, bi nam v prihodnosti koncentracija CIC-ov lahko služila kot dejavnik tveganja za razvoj proteinurije.

5.2.4 Prisotnost proteinurije

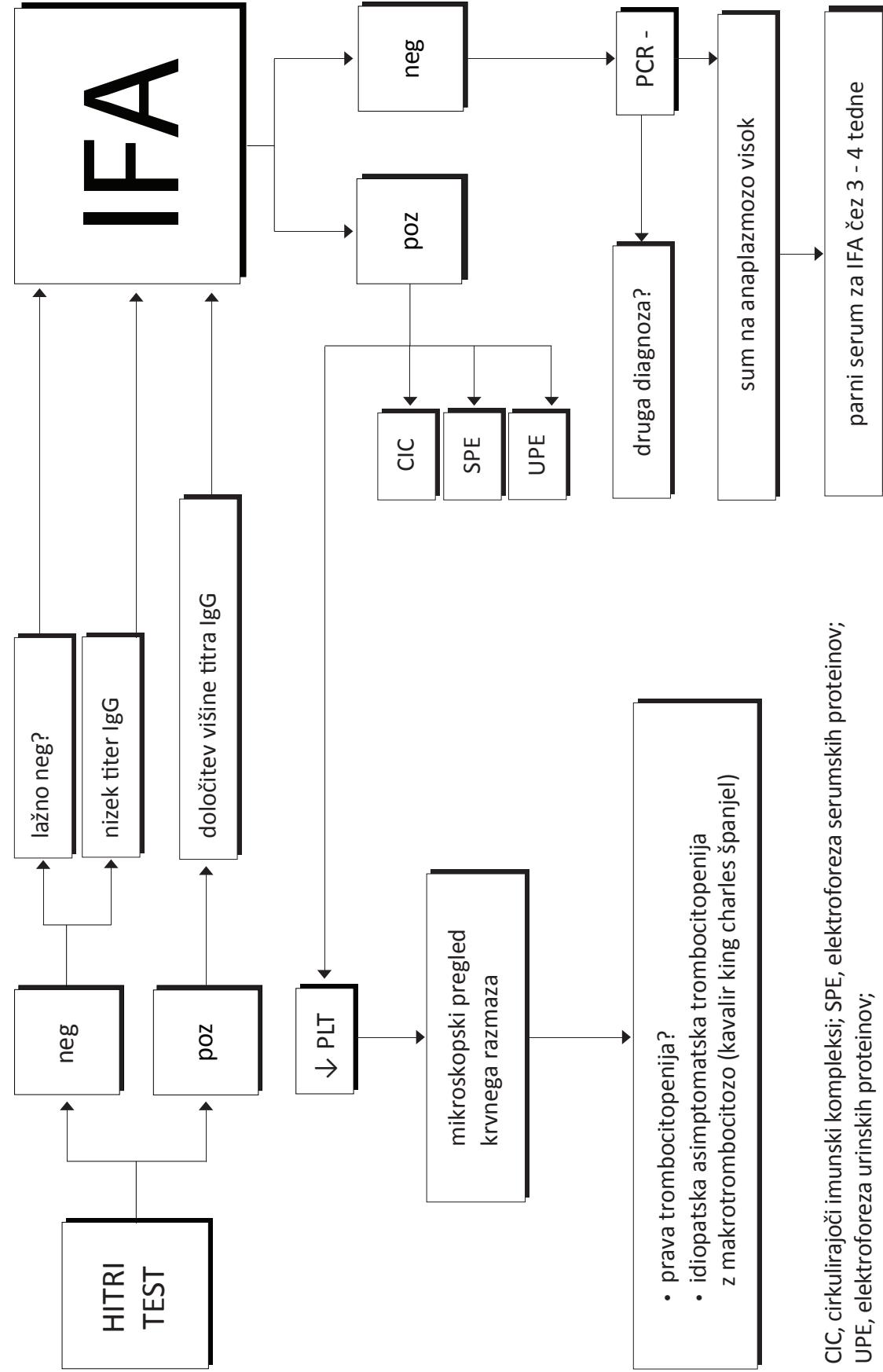
Codner in sodelavci (1992) so raziskovali patogenezo proteinurije pri okužbi z bakterijo *E. canis*. Ugotovili so glomerulopatijo, ki je niso pripisali imunsko pogojenim mehanizmom. Vendar je bila njihova raziskava omejena na akutno fazo erlihioze, zato možnosti, da daljša izpostavitev antigenu v kronični fazi lahko pripelje do imunokompleksnega glomerulonefritisa, ne more biti izključena (Harrus in sod., 2001). Day (2008) opisuje IMGN pri monocitni erlihiozi kot posledico odlaganja CIC-ov v glomerulu, kar privede do aktivacije komplementa in izzove preobčutljivostno reakcijo tipa III. Do posledic odlaganja CIC-ov pride, ko bolezen preide v kronično fazo (Pedersen, 1999). V naši raziskavi smo proteinurijo dokazali v 36-ih (58,1 %) vzorcih. Pri 15-ih (41,7 %) so bili prisotni nizkomolekularni proteini (LMW), ki smo jih zaradi lis na istih molekulskih težah kot pri kontrolni skupini šteli za fiziološke. Pri 11-ih (30,5 %) vzorcih smo dokazali prisotnost srednje- (MMW) in visokomolekularnih (HMW) proteinov, ki so lahko odraz glomerulonefritisa. Proteinurija se sicer lahko prehodno pojavi v febrilni fazi katerekoli bolezni, vendar nobeden izmed psov, pri katerih smo dokazali prisotnost MMW in HMW, ni imel povisane telesne temperature. Statistično značilnih razlik v prisotnosti proteinurije med skupinami psov s pozitivnim IFA ali PCR rezultatom v primerjavi s kontrolno skupino nismo ugotovili. Ker pa smo prisotnost MMW in HMW dokazali izključno pri psih s pozitivnim IFA, bi bilo smiselno nadaljnje spremljanje pacientov z dokazano okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum* in obenem dopolnitev preiskav z imunohistokemičnim barvanjem tkivnih vzorcev ledvic. Pri vseh vzorcih, pri katerih smo z elektroforezo dokazali pojav neselektivne glomerularne proteinurije, smo že pri pregledu urinskega sedimenta ugotovili prisotnost cilindrov. Zato svetujemo elektroforezo urinskih proteinov pri pacientih, pri katerih z rutinsko diagnostiko ugotovimo prisotnost cilindrov in/ali povisan UPC. Pri štirih vzorcih z dostopnimi podatki smo ugotovili prisotnost proteinurije v kombinaciji z visoko koncentracijo CIC-ov (100 %) in trombocitopenijo (75 %) ob prisotnosti različnih IFA titrov (1:256, 1:512 in 2x 1:2048). Glede na to, da se po naših rezultatih visoka koncentracija CIC-ov in trombocitopenija pojavita v akutni fazi bolezni, proteinurija kot znak glomerulonefritisa pa po literarnih podatkih (Pedersen, 1999) šele po dolgotrajni antigenski stimulaciji, to morda pomeni, da

perzistentna okužba z bakterijo *A. phagocytophilum* lahko rezultira v razvoju IMGN in v določenem trenutku privede do akutizacije kliničnih znakov. Čeprav obstajajo eksperimentalni dokazi za kronično okužbo (Egenvall in sod., 2000; Alleman in sod., 2006), ki je po akutni fazi rezultirala v imunsko pogojeni trombocitopeniji, in bi posledično lahko privedla tudi do proteinurije, naši ostali rezultati zaenkrat ne dokazujejo razvoja kronične faze pri anaplazmozi. Glede na to, da se anaplazmoza pojavlja tipično sezonsko z akutnimi znaki in da je na endemičnih področjih visok odstotek asimptomatskih seropozitivnih psov, ki nikoli ne razvijejo bolezni, je najverjetnejše anaplazmoza bolezen, ki ima akuten potek in zelo dobro prognozo ob ustremnem zdravljenju. Vseeno pa zaradi nakazanih možnosti v naši raziskavi dopuščamo možnost razvoja IMGN in načrtujemo povečanje števila vzorcev ter dopolnitev raziskav proteinurije s histološkimi in imunohistokemičnimi preiskavami ledvičnega tkiva.

5.2.5 Algoritem za diagnostiko anaplazmoze

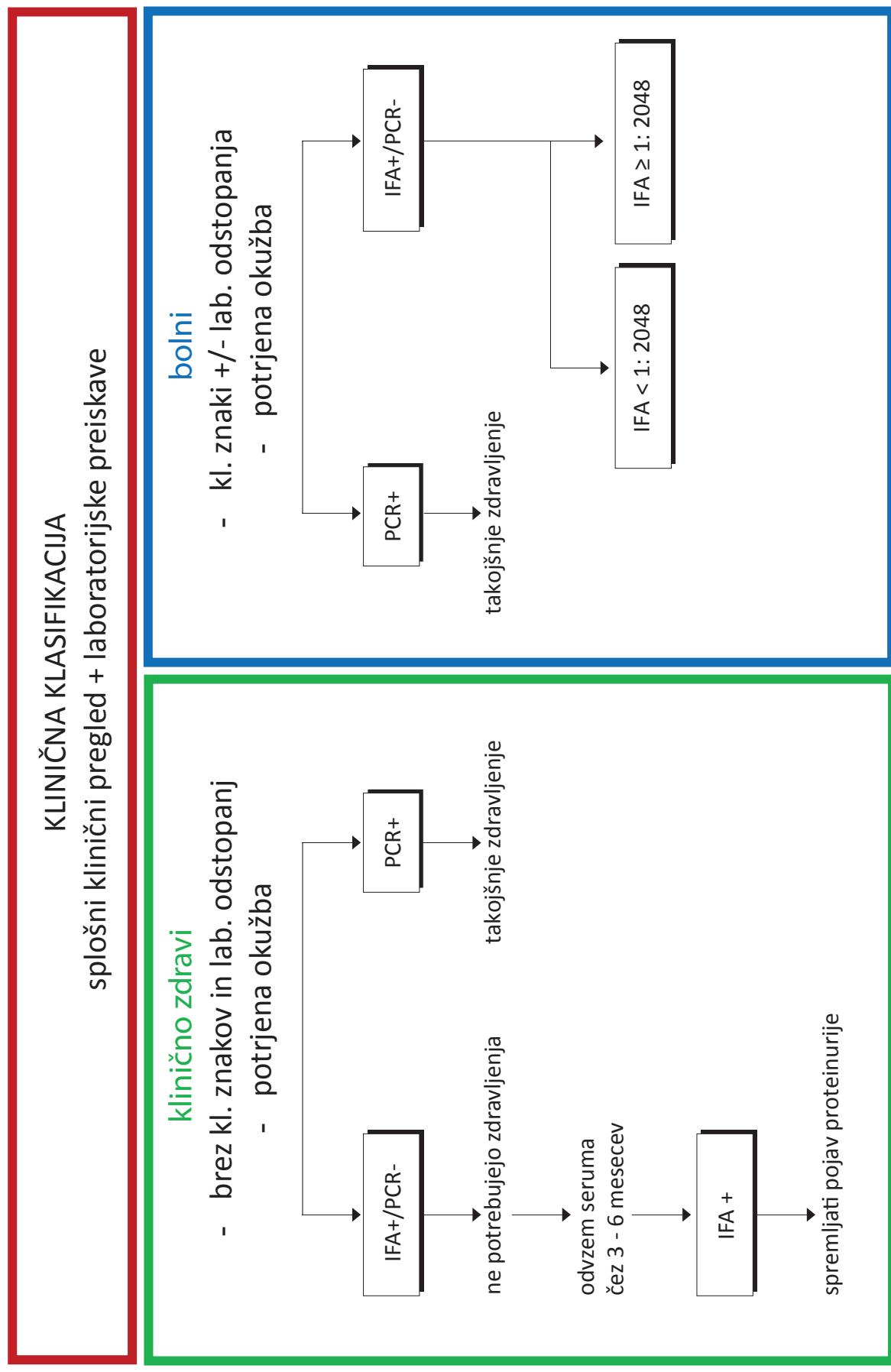
DIAGNOSTIČNI PLAN

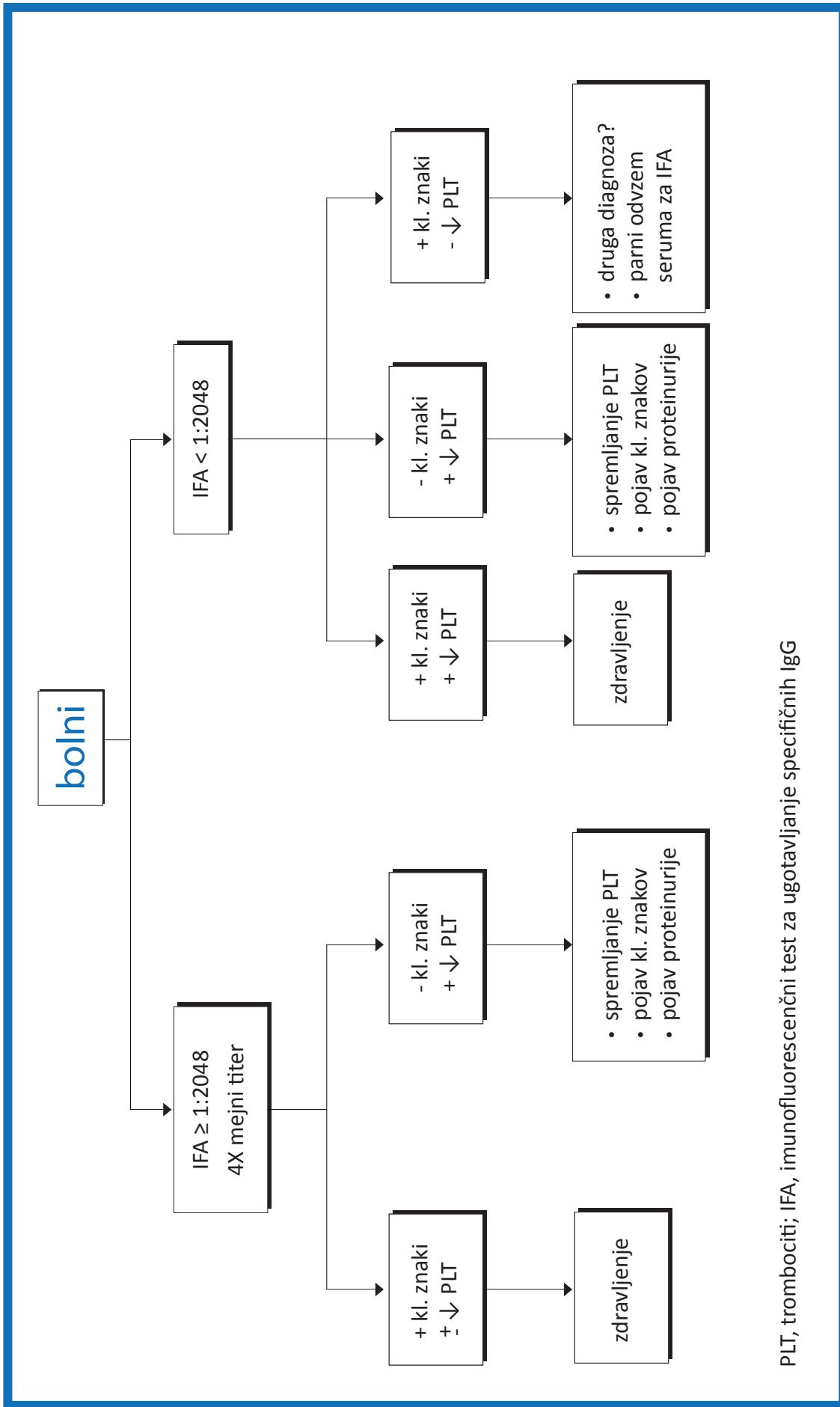
Pes s kliničnimi znaki +/ - laboratorijskimi odstopenji, značilnimi za anaplazmozo



CIC, cirkulirajoči imunski kompleksi; SPE, elektroforeza serumskih proteinov;
UPE, elektroforeza urinskih proteinov;

5.2.6 Algoritem za klinično klasifikacijo in zdravljenje anaplazmoze





PLT, trombociti; IFА, imunofluorescenčni test za ugotavljanje specifičnih IgG

6 SKLEPI

1. Pri naravno okuženih psih z bakterijo *A. phagocytophilum* v Sloveniji smo dokazali 73,8-odstotno pogostost okužbe, kar je bistveno višje od 50-odstotne, kot je opisana v drugih evropskih državah.
2. Samci so nekoliko pogosteje okuženi z bakterijo *A. phagocytophilum* kot samice. Pri posamezni pasmi nismo zaznali razlik v kliničnem poteku bolezni in pasemska porazdelitev je bila bolj verjetno odsev najbolj priljubljenih pasem psov v Sloveniji kot pokazatelj povečane dovzetnosti za okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum* pri omenjenih pasmah. Vseeno smo okužbo pogosteje dokazali pri velikih pasmah psov, kar je v skladu s podatki iz literature.
3. Za okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum* in razvoj bolezni so dovzetni tudi psi, mlajši od enega leta.
4. Sočasno okužbo z bakterijo *B. burgdorferi s.l.* smo dokazali v 30,1 % primerov, kar je nekoliko pogosteje, kot opisuje literatura.
5. Najpogostejsi klinični znaki so bili znaki akutnega infekcijskega sindroma in šepanje, ki so bili najpogosteje prisotni v fazi bakteriemije in pri psih z najvišjim titrom specifičnih protiteles. Pogosteje smo zaznali pojavljanje hujših kliničnih znakov pri psih z nižjimi IFA titri in relativno manj psov brez kliničnih znakov ob pozitivnem IFA titru.
6. Najočitnejša hematološka sprememba v vseh skupinah z izjemo skupine $> 1:2048$ je bila trombocitopenija, ki je bila najizrazitejša v fazi bakteriemije (PCR pozitivni). Rezultati naše raziskave kažejo, da ne glede na višino IFA titra klinične znake anaplazmoze skoraj vedno spremiha trombocitopenija.
7. Obe genetski različici bakterije *A. phagocytophilum*, ki se pojavljata pri psih v Sloveniji, imenovani različica P in različica H, sta zanje patogeni, lahko pa je pri okužbi z eno ali drugo potek bolezni različen. Na to sklepamo na podlagi statistično značilnih razlik v pojavu znakov akutne bolezni, kjer prevladuje genetska različica H, ki se pojavlja pri človeku in psu.

8. Elektroforeze serumskih proteinov kot diagnostične metode, ki bi prispevala k razumevanju poteka bolezni, ne moremo potrditi, saj na elektroforetogramu nismo odkrili statistično značilne razlike v nobeni izmed preiskovanih skupin v primerjavi s kontrolno skupino.
9. Koncentracija CIC-ov je bila neodvisna od višine IFA titra specifičnih protiteles in rezultata PCR, vendar je bila statistično značilno višja pri psih s trombocitopenijo, nizkim razmerjem A/G in hipergamaglobulinemijo. Dokazali smo tudi statistično značilno korelacijo med koncentracijo CIC-ov in proteinurijo.
10. Dokazali smo pojav neselektivne glomerularne proteinurije, ki ni bila povezana z višino titra specifičnih protiteles ali pozitivnim rezultatom PCR. Proteinurija ni statistično značilno odstopala od kontrolne skupine, vendar zaradi relativno majhnega števila vzorcev in odkrite povezave med koncentracijo CIC-ov in pojavom proteinurije, ne moremo popolnoma ovreči možnosti razvoja imunokompleksnega glomerulonefritisa kot posledice okužbe z bakterijo *A. phagocytophilum*. Svetujemo elektroforezo urinskih proteinov pri psih, pri katerih v urinskom sedimentu ugotovimo prisotnost cilindrov in/ali imajo povišan UPC.
11. Skupno naši rezultati ne dokazujejo razvoja kronične faze pri anaplazmozi, ampak potrjujejo dosedanja poročila, da je anaplazmoza bolezen, ki ima akuten potek in dobro prognozo ob ustreznem zdravljenju. Glede na visoko pogostost okužbe pa ta verjetno lahko poteka v subklinični ali perzistentni obliki. Ali je razvoj klinične bolezni rezultat akutizacije, reinfekcije ali posledica imunskeh mehanizmov zaradi dolgotrajne antigenske stimulacije, ostaja predmet nadalnjih raziskav.

7 POVZETEK

V retrospektivni in prospективni raziskavi smo proučevali pojavnost in potek anaplastoze pri naravno okuženih psih. V retrospektivni del smo vključili 749 psov, pri katerih smo ugotovili okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum* v 73,8 %, kar je višje, kot je opisano za ostale evropske države. Vključitveni kriteriji za nadaljnjo preiskavo so bili titri specifičnih protiteles proti bakteriji *A. phagocytophilum* z metodo IFA in/ali pozitiven rezultat PCR testa. Tem kriterijem je ustrezalo 553 psov, pri katerih smo ugotovili minimalno pogostejšo zastopanost samcev. Pasemska porazdelitev je odsevala pogostost posamezne pasme v Sloveniji; pri nobeni od pasem nismo zasledili težjega poteka bolezni. Povprečna starost okuženih psov je bila 5,7 let; okužbo z razvojem kliničnih znakov smo dokazali tudi pri psih, mlajših od enega leta. Sočasno okužbo z bakterijo *B. burgdorferi s.l.* smo dokazali v 30,1 % primerov, kar je nekoliko višje od opisanega sicer za pse v Severni Ameriki. Najpogostejši klinični znaki so bili znaki akutnega infekcijskega sindroma s povišano telesno temperaturo, letargijo in anoreksijo ter šepanjem. Po pričakovanju so bili najbolj izraziti v skupini s pozitivnim rezultatom PCR in najvišjimi titri specifičnih protiteles. V nasprotju z literaturo pa so se pojavili tudi v skupinah z nizkimi IFA titri. Ravno tako smo ugotovili tudi minimalno pojavljanje asimptomatskih psov z nizkimi IFA titri. Ker pa je bil spekter kliničnih znakov v teh skupinah precej širši kot pri skupini s pozitivnim PCR in skupinah z najvišjimi IFA titri, so bili morda ti znaki odsev morebitnega drugega bolezenskega stanja. Ugotovili smo, da se tipični klinični znaki anaplastoze pojavijo v korelaciji s trombocitopenijo, ki je najpogostejše hematološko odstopanje in ni statistično značilno odvisna od višine IFA titra. Povezava trombocitopenije in tipičnih kliničnih znakov v prisotnosti nizkih IFA titrov podpira predlagan odvzem parnih serumov v razmaku vsaj 4-ih tednov, kar predvidevajo trenutno veljavni kriteriji za akutno anaplastozo. Ostala hematološka odstopanja niso bila izven referenčnih mej. Edina biokemijska spremembra je bilo zmerno povišanje aktivnosti AP pri seropozitivnih psih. Ugotovili smo, da obe genetski različici bakterije *A. phagocytophilum*, ki okužujeta pse v Sloveniji, pri njih lahko povzročita klinično sliko; različica H, ki se pojavlja pri človeku in psu, pogosteje izzove akutne klinične znake kot različica P, ki se pojavlja samo pri psu. Statistično značilne disproteinemije pri nobeni skupini v primerjavi s kontrolno nismo dokazali, vendar smo odkrili povezavo med trombocitopenijo, prisotnostjo cirkulirajočih imunskeih kompleksov in nižjim razmerjem A/G ter hipergamaglobulinemijo, ki karakterizirajo aktivne imunske procese, zaradi katerih je zdravljenje smiselno. Ta odstopanja

so se pojavila neodvisno od višine IFA titra in pozitivnega rezultata PCR, kar poudarja, da enkraten nizek IFA titer ne more biti izključujoči dejavnik za bolezen. Prav tako visok IFA titer, ki ga ne spremlja trombocitopenija in tipični klinični znaki, ne pomeni bolezni. Neselektivno glomerularno proteinurijo smo dokazali pri 30,5 % psov s proteinurijo, kar ni bilo statistično značilno različno od kontrolne skupine. Na majhnem številu vzorcev smo odkrili povezavo med visoko koncentracijo cirkulirajočih imunskih kompleksov in pojmom proteinurije, ki morda pomeni, da okužba z bakterijo *A. phagocytophilum* lahko privede do razvoja imunokompleksnega glomerulonefritisa, kar bi lahko potrdili s povečanjem števila vzorcev ter dopolnitvijo raziskav proteinurije z imunohistokemijo ledvičnega tkiva. Rezultati naše raziskave ne dokazujejo razvoja kronične faze pri anaplazmozi, ampak gre najverjetnejše za bolezen z akutnim potekom in zelo dobro prognozo ob pravilnem zdravljenju.

SUMMARY

The retrospective and prospective study was designed to investigate the incidence and clinical course of anaplasmosis in naturally infected dogs. In 749 dogs in the retrospective study, there was 73.8 % prevalence of *A. phagocytophilum* infection, which is higher than estimated in other European countries. Inclusion criteria for further investigation included a positive IFA titre of specific *A. phagocytophilum* antibodies and/or the PCR positive result. 553 dogs met those criteria, of which males were slightly overrepresented. Breed distribution reflected breed popularity in Slovenia; there was no difference in the severity of the disease in an individual breed. The mean age of infected dogs was 5.7 years; an infection which progressed to the clinical disease was demonstrated also in dogs which were less than a year old. A coinfection with *B. burgdorferi s.l.* was confirmed in 30.1 % of dogs, which is again higher than reported in dogs from North America. Clinical signs of the acute infection syndrome including elevated body temperature, lethargy, anorexia and lameness were the most frequent not only in the PCR positive group and in groups with the highest IFA titre, but also in groups with the lower IFA titre, which is in contrast to previous reports. There was also a relatively low number of asymptomatic dogs with low IFA titres. But the range of clinical signs in those groups was much wider than in the PCR positive group and the group with the highest IFA titre so there is a possibility that not all clinical signs can be attributed to the *A. phagocytophilum* infection. We demonstrated that typical clinical signs of anaplasmosis are accompanied by thrombocytopenia, which is the most frequent hematological abnormality and is not in correlation with the IFA titre. This supports a recommended taking of paired serum samples which should be taken four weeks or more apart and which are suggested by currently acknowledged criteria for acute anaplasmosis. Other hematological parameters stayed within the reference interval. The only biochemical change was a slight increase in alkaline phosphatase activity in seropositive dogs. We found out that both genetic variants of *A. phagocytophilum*, which infects dogs in Slovenia, can cause a clinical disease. The H variant, which infects both humans and dogs, more frequently results in acute signs of the disease than the P variant, which infects only dogs. There was no statistically significant difference in dysproteinemia in any of the groups in comparison with the control group; however, we demonstrated a correlation between thrombocytopenia, the occurrence of circulating immune complexes and the lower A/G ratio together with hypergammaglobulinemia, which are all characteristic of an active immune process which

justifies the treating of an animal. These discrepancies were independent of the amount of the IFA titre and the PCR positive result, which emphasizes that the low IFA titre in an individual serum sample cannot exclude the disease nor can the high IFA titre which is not accompanied by thrombocytopenia and typical clinical signs confirm it. Non-selective glomerular proteinuria was demonstrated in 30.5 % of proteinuric patients, which was not statistically significant compared to the control group. However, we demonstrated a correlation between a high concentration of circulating immune complexes and proteinuria in a very small sample size; this leads to the assumption that the *A. phagocytophilum* infection can result in immune-mediated glomerulonephritis. That calls for greater sampling and additional immunohistochemical tests on renal tissue samples. The results of our study indicate that anaplasmosis does not progress into a chronic phase, but it is rather an acute disease and bears favourable prognosis with a proper treatment.

8 ZAHVALE

Cenjeni mentorici, *prof. dr. Nataši Tozon*. Iz srca hvala, ker si mi na široko odprla vrata, ne samo v raziskovanje, ampak tudi v klinično delo in medsebojne odnose. Ker veš, kdaj moraš pomagati in kdaj zahtevati. Ker si mi vedno na voljo in s svojim delom postavljaš vzor.

Spoštovanim – predsednici *prof. dr. Olgi Zorman Rojs* in članicama komisije *prof. dr. Tatjani Avšič Županc* in *prof. dr. Stanki Lotrič-Furlan* za oceno doktorske disertacije. Hvala, ker ste s svojimi komentarji obogatile pričajoče delo.

Dr. Blanki Premrov Bajuk in *Katarini Babnik*. Hvala, ker sta uspeli udejaniti naše diagnostične metode. In za neizmerno pregledno podane rezultate ter neskončna pojasnila. Vidve dajeta pravi pomen sodelovanju znotraj fakultete.

Dr. Brigit Slavec. Za dokaz, da je tudi laboratorijsko delo lahko zanimivo in vznemirljivo.

Katji Strašek Smrdel. Ker si mi pomagala videti anaplastmo tudi z drugimi očmi. Hvala za vse posredovane podatke in spodbudne misli v predalu elektronske pošte.

Dr. Albertu Franceschiju. Za zmanjšanje razdalje med Slovenijo in Italijo. Za vse dodatno delo, opravljeno za nekoga, ki ga pravzaprav sploh ne pozna. Za dokaz, da znanje in vedoželjnost ne poznata mej.

Mag. Petru Levstku, načelniku Veterinarske enote Slovenske vojske, VVUXIV, za dovoljenje, veterinarki *Monji Ribič* ter medicinski sestri *Bernardi Kruška* za pomoč pri delu z delovnimi psi Slovenske vojske, enote v Primožih.

Mag. Giti Greč Smole za pomoč pri pregledu literature, *Stanki Ujc* in *Slavici Sekulić* za pomoč pri iskanju člankov.

Lektoricama *Urški Mehle*, profesorici slovenskega jezika, za lektoriranje slovenskega in *Sabini Jezovšek* za lektoriranje angleškega teksta. Statističarki *doc. dr. Lari Lusa* za statistično obdelavo podatkov.

Sodelavcem s KKMŽ. Tehnikom za neskončno brskanje za kartotekami. *Aleksandru* za shranjevanje vzorcev in neomejeno obveščanje. *Darji* za vse namige in tehnične nadrobnosti. *Sari*, ker verjame vame in mi to tudi pove. Za spodbudne besede, ko mi je bilo najtežje.

Goramu in Katerini, cimroma, zaradi katerih je 'pingvinišče' postalo zatočišče in vrelec novih idej obenem. *Vsem ostalim*, za vse, kar je bilo in kar še bo.

Mami in očetu. Hvala za vso podporo in neizmerno zaupanje. Hvala, da sta me zgodaj spustila v svet in obenem ves čas nestrpno pričakovala. Zaradi vaju danes lahko pišem to zahvalo.

Juretu. Šala o lepem bratu in pametni sestri dobiva svoj epilog...

Mihu. Ker mi daješ zalet in me hkrati prizemljiš. Ker si z mano že od samega začetka.

Mami Majdi, za dokaz, da se v življenju da premagati vse najhujše. Kjer je volja, tam je pot.

Lari. Čeprav še ne razumeš, zaradi tebe moje delo dobiva drugačen pomen. Ne samo moje delo, ampak moje življenje nasploh.

Kris, ker si me že na začetku študija naučila razmejiti čas. In za vse, kar počneš danes. Občudujem tvoj pogum.

Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za štipendiranje raziskav in finančno podporo vsa leta izobraževanja. 'Za vse nevarnosti, ki pretijo svetu, lahko najdemo vzrok v znanosti. A vse odrešitve sveta bodo prav tako izvirale iz znanosti.' *Isaac Asimov*

Ati, to je zate.

9 LITERATURA

- 1 Abeygunawardena I, Kakoma I, Smith RD (1990). Pathophysiology of canine ehrlichiosis. In: Williams JC, Kakoma I, eds. Ehrlichiosis: a vector-borne disease of animals and humans. Boston: Kluwer Academic Publishers, 78–92.
- 2 Aguero-Rosenfeld ME (2002). Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: state of the art. Vector Borne Zoonotic Dis 2: 233–9.
- 3 Alleman AR, Chandrashekhar R, Beall M et al. (2006). Experimental inoculation of dogs with a human isolate (Ny18) of *Anaplasma phagocytophilum* and demonstration of persistent infection following doxycycline therapy. J Vet Intern Med 20: 763.
- 4 Alleman AR, Wamsley HL, Abbott J et al. (2007). Experimental *Anaplasma phagocytophilum* infection of dogs by intravenous inoculation of human and canine isolates and treatment with doxycycline. Vet Pathol 44: 19.
- 5 Allen LAH (2003). Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. Microbes Infect 5: 1329–35.
- 6 Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C et al. (1996). Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. J Am Med Assoc 275: 199–205.
- 7 Bakken JS, Dumler S (2000). Human granulocytic ehrlichiosis. Clin Infect Dis 31: 554–60.
- 8 Bakken JS, Dumler S (2008). Human granulocytic anaplasmosis. Infect Dis Clin North Am 22: 443–8.
- 9 Barutzki D, De Nicola A, Zeziola M et al. (2006). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 119: 342–7.
- 10 Bass DA, Gonwa TA, Szejda P et al. (1980). Eosinopenia of acute infection. Production of eosinopenia by chemotactic factors of acute inflammation. J Clin Invest 65: 1265–71.
- 11 Beall MJ, Chandrashekhar R, Eberts MD et al. (2008). Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. Vector Borne Zoonotic Dis 8: 455–464.

- 12 Birkner K, Steiner B, Rinkler C et al. (2008). The elimination of *Anaplasma phagocytophilum* requires CD41 T cells, but is independent of Th1 cytokines and a wide spectrum of effector mechanisms. *Eur J Immunol* 38: 3395–410.
- 13 Björsdorff A (2005). Ehrlichiosis and anaplasmosis. Part 2: Granulocytic ehrlichiosis: *Anaplasma phagocytophilum* comb. nov (*E. phagocytophila* genogroup) infection. In: Shaw SE, Day MJ, eds. Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. London: Manson Publishing, 127–32.
- 14 Bowman D, Little SE, Lorentzen L et al. (2009). Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. *Vet Parasitol* 160: 138–48.
- 15 Bown KJ, Lambin X, Telford GR et al. (2008). Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. *Appl Environ Microbiol* 74: 7118–25.
- 16 Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI (1998). Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J Clin Microbiol* 36: 2645–51.
- 17 Brouqui P, Bacellar F, Baranton G et al. (2004). Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 10: 1108–32.
- 18 Cao WC, Zhao QM, Zhang PH et al. (2000). Granulocytic ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. *J Clin Microbiol* 38: 4208–10.
- 19 Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE (2009). Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med* 23: 1129–41.
- 20 Carlyon JA, Fikrig E (2003). Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* 5(119): 743–54.
- 21 Carlyon JA, Troese MJ (2008). Assessment of differential cellular adherence, invasion, receptor recognition, and outer membrane protein expression by *Anaplasma phagocytophilum*

dense core and reticulate cells. In: 5th International meeting on Rickettsiae and rickettsial diseases: program abstract book. Marseille, 27.

22 Chapman AS, Bakken JS, Folk SM et al. (2006). Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis – United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. MMWR Recomm Rep 55 (RR-4): 1–27.

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5504a1.htm> (1. marec 2012)

23 Ciaramella P, Oliva G, Luna RD et al. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet Rec 141: 539–43.

24 Codner EC, Caceci T, Saunders GK et al. (1992). Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. Am J Vet Res 53: 2286–91.

25 Čižman M, Avšič Županc T, Petrovec M, Ruzić-Sabljić E, Pokorn M (2000). Seroprevalence of ehrlichiosis, Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis infections in children and young adults in Slovenia. Wien Klin Wochenschr 112: 842–5.

26 Dautel H, Kahl O (1999). Ticks (Acari: Ixodoidea) and their medical importance in the urban environment. In: Proceedings of the 3rd International Conference in Urban Pests. Prague, 73–82.

<http://www.icup.org.uk/reports\ICUP481.pdf> (1. marec 2012)

27 Day MJ (1987). A study of the immune response in canine disseminated aspergillosis. Murdoch University, School of Veterinary Studies. Doktorska disertacija

28 Day MJ (2003). Infectious triggers of immune-mediated disease. In: Zbornik referatov 14. simpozija o aktualnih boleznih malih živali. Poljče, 2003. Ljubljana: Slovensko združenje veterinarjev za male živali, 16–8.

29 Day MJ (1999). Immune-mediated renal and reproductive disease. In: Day MJ, ed. Clinical immunology of the dog and cat. London: Manson Publishing, 171–80.

30 de la Fuente J, Massung RF, Wong SJ et al. (2005). Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. J Clin Microbiol 43: 1309–17.

- 31 de la Fuente J, Ruiz-Fons F, Naranjo V et al. (2008). Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. Res Vet Sci 84: 382–6.
- 32 Dumler JS, Bakken JS (1995). Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. Clin Infect Dis 20: 1102–10.
- 33 Dumler JS, Walker DH (2001). Tick-borne ehrlichiosis. Lancet Infect Dis 1: 21–8.
- 34 Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N et al. (2007). Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. Clin Infect Dis 45(Suppl 1): S45–51.
- 35 Dumler JS (2012). The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. Immunol Med Microbiol 64: 13–20.
- 36 Duncan MJ, Shin JS, Abraham SN (2002). Microbial entry through caveolae: variations on a theme. Cell Microbiol 4: 783–91.
- 37 Egenvall AE, Hedhammar AA, Björsdorff AI (1997). Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. Vet Rec 140: 222–6.
- 38 Egenvall A, Björsdorff A, Lilliehöök I et al. (1998). Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. Vet Rec 143: 412–7.
- 39 Egenvall A, Lilliehöök I, Björsdorff A et al. (2000). Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. Vet Rec 146: 186–90.
- 40 Foggie A (1951). Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. J Pathol Bacteriol 63: 1–15.
- 41 Foley JE, Foley P, Madigan JE (2001). Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. Am J Vet Res 62: 1599–605.
- 42 Foley JE, Nieto NC, Adjemian J et al. (2008). *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal hosts of *Ixodes ticks*, western United States. Emerg Infect Dis 14: 1147–50.
- 43 Gavazza A, Sacchini E (2009). Clinical, laboratory, diagnostic and prognostic aspects of canine lymphoma: a retrospective study. Comp Clin Pathol 18: 291–9.

- 44 Goodman JL, Nelson CM, Klein MB et al. (1999). Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. *J Clin Invest* 103: 407–12.
- 45 Granquist EG, Stuen S, Crosby L et al. (2010). Variant-specific and diminishing immune responses towards the highly variable MSP2(P44) outer membrane protein of *Anaplasma phagocytophilum* during persistent infection in lambs. *Vet Immunol Immunopathol* 133: 117–24.
- 46 Gravino AE, Caprariis S, Manna L et al. (1997). Preliminary report of infection in dogs related to *Ehrlichia equi*: description of three cases. *New Microbiol* 20: 361–3.
- 47 Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ (1996). Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol* 34: 44–8.
- 48 Greig B, Armstrong JP (2006). Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). In: Greene CE, ed. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders company, 219–24.
- 49 Gray JS (1991). The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev Med Vet Entomol* 79: 323–33.
- 50 Gross DM, Forsthuber T, Tary-Lehmann M et al. (1998). Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant lyme arthritis. *Science* 281: 703–6.
- 51 Harrus S, Waner T, Avidar Y, Begn E, Peh H, Bark H (1996). Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 66: 241–9.
- 52 Harrus S, Waner T, Weiss DJ et al. (1996). Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 51: 13–20.
- 53 Harrus S, Day MJ, Waner T, Bark H (2001). Presence of immune-complexes , and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet Microbiol* 83: 343–9.
- 54 Harrus S, Waner T (2005). Ehrlichiosis and anaplasmosis. Part 1: *Ehrlichia canis* genogroup. In: Shaw SE, Day MJ, eds. Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. London: Manson Publishing, 120–6.

- 55 Herron MJ, Nelson CM, Larson J et al. (2000). Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science* 288: 1653–6.
- 56 Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B et al. (2003). Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in Central Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 364–7.
- 57 Hodzic E, Ijdo JW, Feng S et al. (1998). Granulocytic ehrlichiosis in the laboratory mouse. *J Infect Dis* 177: 737–45.
- 58 Hovius KE (2005). Borreliosis. In: Shaw SE, Day MJ, eds. Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. London: Manson Publishing, 100–9.
- 59 Hubálek Z, Halouzka J (1997). Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe: a review. *Eur J Epidemiol* 13: 951–7.
- 60 Jäderlund KH, Egenval A, Bergström K et al. (2007). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. *Vet Rec* 160: 825–31.
- 61 Jaenson TGT, Tälleklint L, Lundqvist L, Olsén B, Chirico J, Mejlon H (1994). Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (Acari: *Ixodidae*, *Argasidae*) in Sweden. *J Med Entomol* 31: 240–56.
- 62 Jutras I, Abrami L, Dautry-Varsat A (2003). Entry of the lymphogranuloma venereum strain of *Chlamydia trachomatis* into host cells involves cholesterol-rich membrane domains. *Infect Immun* 71: 260–6.
- 63 Katavolos P, Armstrong PM, Dawson JE, Telford SR (1998). Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 177: 1422–5.
- 64 Kohn B, Galke D, Beelitz P et al. (2008). Clinical features of canine granulocytic ehrlichiosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 22: 1289–95.
- 65 Kolbert CP (1996). Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR. In: Persing DH, ed. PCR protocols for emerging infectious diseases. Washington: ASM Press, 106–11.

- 66 Komnenou AA, Mylonakis ME, Kouti V et al. (2007). Ocular manifestation of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Vet Ophthalmol* 10: 137–42.
- 67 Kurtenbach K, Sewell HS, Schäfer S, De Michelis S (1999). Systematics, biology and ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentrbl Bakteriol* 289: 639–42.
- 68 Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–5.
- 69 Lee HC, Goodman JL (2006). *Anaplasma phagocytophilum* causes global induction of antiapoptosis in human neutrophils. *Genomics* 88: 496–503.
- 70 Lepidi H, Bunnell JE, Martin ME et al. (2000). Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *Am J Trop Med Hyg* 62: 29–37.
- 71 Levinson SS, Goldman J (1983). Absorbance nephelometry of C1q-precipitable immune complexes: method comparisons and clinical correlations. *Clin Chem* 29: 2082–6.
- 72 Lilliehöök I, Egenval A, Tvedten HW (1998). Hematopathology in dogs experimentally infected with a Swedish granulocytic *Ehrlichia* species. *Vet Clin Pathol* 27: 116–22.
- 73 Lin M, Rikihisa Y (2003). Obligatory intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Cell Microbiol* 5(11): 809–20.
- 74 Lotrič-Furlan S, Rojko T, Petrovec M, Avšič Županc T, Strle F (2006). Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* 118: 2916–21.
- 75 Madigan JE, Gribble D (1987). Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968–1981). *J Am Vet Med Assoc* 190: 445–8.
- 76 Maretzki CH, Fisher DJ, Greene CE (1994). Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 205: 1554–6.

- 77 Massung RF, Courtney JW, Hiratzka SL et al. (2005). *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerg Infect Dis* 11: 1604–6.
- 78 Massung RF, Slater KG (2003). Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol* 41: 717–22.
- 79 Nijhof AM, Bodaan C, Postigo M et al. (2007). Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 585–95.
- 80 Norkin LC, Wolfrom SA, Stuart ES (2001). Association of caveolin with *Chlamydia trachomatis* inclusions at early and late stages of infection. *Exp Cell Res* 266: 229–38.
- 81 Nuttall P A, Labuda M (1994). Tick-borne encephalitis subgroup. In: Sonenshine DE, Mather T N, eds. Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. New York: Oxford University Press, 351–91.
- 82 Panciera RJ, Ewing SA, Confer AW (2001). Ocular histopathology of ehrlichial infections in the dog. *Vet Pathol* 38: 43–6.
- 83 Pedersen NC (1999). A review of immunologic diseases of the dog. *Vet Immunol Immunopatol* 69: 251–342.
- 84 Perini JM, Dehon B, Marianne T, Foulard M (1987): Evaluation by immunoblotting of the criteria for tubular lesions diagnostic with urinary SDS-PAGE. *Clin Chim Acta* 169: 255–66.
- 85 Petrovec M, Lotrič Furlan S, Avšič Županc T et al. (1997). Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol* 35: 1556–9.
- 86 Petrovec M, Bidovec A, Sumner JW et al (2002). Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. *Wien Klin Wochensch* 14: 641–647.
- 87 Plier ML, Breitschwerdt EB, Hegarty BC et al. (2009). Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *J Am Anim Hosp Assoc* 45(5): 232–8.
- 88 Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ et al. (2005). Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in western Washington State. *J Clin Microbiol* 43: 796–801.

- 89 Purnell RE, Joyner LP (1968). The development of *Theileria parva* in the salivary glands of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. Parasitology 58: 725–32.
- 90 Ravnik U, Tozon N, Strašek Smrdel K, Avšič Županc T (2011). Anaplasmosis in dogs: the relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. Vet Microbiol 149: 172–6.
- 91 Reardon MJ, Pierce KR (1981). Acute experimental canine ehrlichiosis. 1. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. Vet Pathol 18: 48–61.
- 92 Ribeiro JMC, Mather TN, Piesman J, Spielman A (1987). Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (acari; *Ixodidae*). J Med Entomol 24: 201–5.
- 93 Richter PJ, Kimsey RB, Madigan JE et al. (1996). *Ixodes pacificus* (Acari: *Ixodidae*) as a vector of *Ehrlichia equi* (*Rickettsiales: Ehrlichiae*). J Med Entomol 33: 1–5.
- 94 Rikihisa Y (2006). *Ehrlichia* subversion of host innate responses. Curr Opin Microbiol 9(1): 95–101.
- 95 Santos AS, Santos-Silva MM, Sousa RD et al. (2009). PCR-based serosurvey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese ticks (Acari: *Ixodidae*). Vector Borne Zoonotic Dis 9(1): 33–40.
- 96 Scorpio DG, von Loewenich FD, Goebel H, Bogdan C, Dumler JS (2006). Innate immune response to *Anaplasma phagocytophilum* contributes to hepatic injury. Clin Vaccine Immunol 13: 806–9.
- 97 Santos AS, Santos-Silva MM, Almeida VC et al. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: *Ixodidae*) from Madeira Island and Sebutal District, mainland Portugal. Emerg Infect Dis 10: 1643–8.
- 98 Scorpio DG, Dumler JS, Barat NC et al. (2011). Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. Vector Borne Zoonotic Dis 11(3): 223–9.
- 99 Sevelius E, Andersson M (1995). Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. Vet Rec 137: 663–7.

- 100 Shin JS, Abraham SN (2001). Caveolae as portals of entry for microbes. *Microbes Infect* 3: 755–61.
- 101 Skerget M, Wenisch C, Daxboeck F et al. (2003). Cat or dog ownership and seroprevalence of ehrlichiosis, Q fever, and cat-scratch disease. *Emerg Infect Dis* 9: 1337–40.
- 102 Stańczak J, Gabre RM, Kruminis - Łozowska W, Racewicz M, Kubica - Biernat B (2004). *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med* 11: 109–14.
- 103 Stierle HE, Oser B, Boesken WH (1990): Improved classification of proteinuria by semiautomated ultrathin SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Nephrol* 33: 168–73.
- 104 Strasek Smrdel K, Bidovec A, Malovrh T, Petrovec M, Duh D, Avsic Zupanc T (2009). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar in Slovenia. *Clin Microbiol Infec* 15 (S2): 50–52.
- 105 Strik N, Alleman AR, Barbet AF et al. (2007). Characterization of major surface protein 5 of *Anaplasma phagocytophilum* and the extent of cross-reactivity with *A. marginale*. *Clin Vaccine Immunol* 14: 262–8.
- 106 Strle F (2004). Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int J Med Microbiol* 293(Suppl 37): 27–35.
- 107 Sukumaran B, Carlyon JA, Cai JL et al. (2005). Early transcriptional response of human neutrophils to *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Infect Immun* 73(12): 8089–99.
- 108 Swanson JF, Dubielzig RR (1986). Clinical and histopathologic characteristics of acute canine ocular ehrlichiosis. *Trans Am Coll Vet Ophthalmol* 17: 219–32.
- 109 Taylor SM (2003). Clinical manifestations of and diagnostic tests for joint disorders. In: Nelson RW, Couto CG, eds. *Small animal internal medicine*. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1071–8.
- 110 Telford SR, Dawson JE, Katavolos P et al. (1996). Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6209–14.

- 111 Tozon N, Petrovec M (2002). Erlihioza (anaplasmoza) v Sloveniji. In: WSAVA Eastern European continuing education international symposium: proceedings. Radenci, 2002. Ljubljana: Slovensko združenje veterinarjev za male živali, 41–7.
- 112 Tozon N, Petrovec M, Avšič Županc T (2003). Clinical and laboratory features of first detected cases of *A. phagocytophila* in dogs from Slovenia. Ann NY Acad Sci 990: 424–8.
- 113 Troy CG, Vulgamott JC, Turnwald GH (1980). Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. J Am Anim Hosp Assoc 16: 181–7.
- 114 Vaden SL, Knoll JS, Smith FWK, Tilley LP (2009). Protein electrophoresis. In: Blackwell's five minute veterinary consult: laboratory tests and diagnostic procedures: canine and feline. Vaden SL, Knoll JS, Smith FWK, Tilley LP, eds. Ames: Willey-Blackwell, 501–3.
- 115 Vaden SL, Grauer GF (2011). Glomerular disease. In: Bartges J, Polzin DJ, eds. Nephrology and urology of small animals. Oxford: Blackwell Publishing, 538–46.
- 116 Walls JJ, Caturegli P, Bakken JS et al. (2000). Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using epank1 genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group *Ehrlichiae*. J Clin Microbiol 38: 354–6.
- 117 Walter T, Olivares M, Pizzaro F, Munoz C (1997). Iron, anemia and infection. Nutr Rev 55: 111–24.
- 118 Waner T, Harrus S, Weiss DJ et al. (1995). Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Vet Immunol Immunopathol 48: 177–82.
- 119 Waner T, Strenger C, Keysary A, Harrus S (1998). Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. Vet Immunol Immunopatol 66: 237–43.
- 120 Waner T, Keysary A, Bark H et al. (1999). Canine monocytic ehrlichiosis: an overview. Isr J Vet Med 54(4), e 7 str.
<http://www.isrvma.org/ImageToArticle/Files/Vol%2054%204%20Canine%20Monocytic%20Ehrlichiosis.doc> (1. marec 2012)

- 121 Waner T, Leykin I, Shinitsky M et al. (2000). Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Immunol Immunopathol* 77: 145–50.
- 122 Woo KT, Lau YK, Lee GSL et al. (1991). Pattern of proteinuria in Ig A nephritis by SDS-PAGE : clinical significance. *Clin Nephrol* 36: 6–11.
- 123 Woody BJ, Hoskins JD (1991). Ehrlichial disease of dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21: 75–98.
- 124 Zhang L, Liu Y, Ni D et al. (2008). Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *J Am Med Assoc* 300: 2263–70.

10 PRILOGE

10.1 Zbirna tabela osnovnih kliničnih podatkov, koncentracije CIC-ov ($\mu\text{g/ml}$) in PLT ($\times 10^9/\text{l}$) serološko pozitivnih psov (+ prisoten; - odsoten; prazno polje – preiskava ni bila opravljena)

Zap.št	IFA	Klinični znaki											CIC	PLT
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	1:128	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	334,8	7
2	1:128	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	369,1	179
3	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	169,2	231
4	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	212,1	311
5	1:128	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0	186
6	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	227	199
7	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	379
8	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	289,6	560
9	1:128												515	
10	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	340
11	1:128	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	77
12	1:128	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	255	265
13	1:128	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	305	
14	1:128	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	249,8	247
15	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	256
16	1:128												289,6	
17	1:128	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	574,3	99
18	1:128												65,7	
19	1:128	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	296,6	177
20	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	507,9	251
21	1:128	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	290	145
22	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	609,8	119
23	1:128	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	340,9	70
24	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	87
25	1:128	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	177,4	8
26	1:128	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	148,3	140
27	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	469
28	1:128	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	349,4	281
29	1:128												364,1	138
30	1:128	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	226,5	30
31	1:128	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	25	
32	1:128	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	0	196
33	1:128	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	305	
34	1:128	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0	235
35	1:128	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	6	
36	1:256	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	154	
37	1:256	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95,1	206
38	1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	375	
39	1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	491,2	254
40	1:256	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	107	
41	1:256	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	712,4	141
42	1:256	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	244,5	238
43	1:256	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	375,6	209
44	1:256												381	
45	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	46
46	1:256	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	36	
47	1:256	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	103	
48	1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	271	
49	1:256	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	321	
50	1:256	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	35	
51	1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	234	
52	1:256	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	23	
53	1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	192,8	266

54	1:256	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	157
55	1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	220	303
56	1:256	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	130
57	1:256	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	9
58	1:256	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	0	148
59	1:256	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	125,6	169
60	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	30
61	1:256													800	252
62	1:256	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	294,2	170
63	1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56,4	322
64	1:256	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	184
65	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	257
66	1:256													323,3	257
67	1:256													360,6	145
68	1:256	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	1310	311
69	1:256	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	932	12
70	1:256	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	30	227
71	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	621,3	348
72	1:256	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1372,4	49
73	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	482,2	67
74	1:256	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	200	213
75	1:256													244,5	142
76	1:256	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	248,8	99
77	1:512	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	73,5	248
78	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	69
79	1:512													228,7	186
80	1:512	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	210
81	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	249
82	1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	150
83	1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	188	223
84	1:512	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	192
85	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	359,9	165
86	1:512													0	
87	1:512	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	213,9	
88	1:512	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
89	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46,9	299
90	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	231,1	349
91	1:512	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	150
92	1:512	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	256
93	1:512	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	156
94	1:512	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	362,3	202
95	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41,2	261
96	1:512	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	122
97	1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	101,5	310
98	1:512													-	286
99	1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	77
100	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	130,5	382
101	1:512													90,6	595
102	1:512													1000	150
103	1:512													197,8	
104	1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	338
105	1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	333
106	1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	46
107	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	490	184
108	1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0	132
109	1:512													180,8	189
110	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	348	191
111	1:512													260,9	
112	1:512													404	174
113	1:512	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	81,5	5
114	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	408,2	259
115	1:512	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	117,9	340
116	1:512													445	304
117	1:512													685,3	97
118	1:512	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0	51

119	1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1290	183
120	1:512													357,5	159
121	1:512	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	105,6	216
122	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	624,7	185
123	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	398	
124	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	153,3	197
125	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	64,7	237
126	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	242	
127	1:1024	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	460	187
128	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	241
129	1:1024	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	691	79
130	1:1024	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	239,9	174
131	1:1024													160	
132	1:1024	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	166,9	15
133	1:1024	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	230,4	3
134	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	168
135	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	314	
136	1:1024	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	481	
137	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	253	
138	1:1024													0	
139	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	255	
140	1:1024													359,9	632
141	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	195
142	1:1024													377	
143	1:1024	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	112,3	348
144	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	251
145	1:1024													10	
146	1:1024													179	
147	1:1024	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	436,9	156
148	1:1024													131	
149	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	340	
150	1:1024													16	
151	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	247	
152	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	145
153	1:1024													299	
154	1:1024													458,6	
155	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	238
156	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72	
157	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	398
158	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1597,6	595
159	1:1024	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	414	
160	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,2	180
161	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	14	
162	1:1024													135	
163	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	130	
164	1:1024	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	307,4	236
165	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	118	
166	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	84,3	224
167	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	85	262
168	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	83,4	317
169	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	114,2	344
170	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	590,9	379
171	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	715	278
172	1:1024	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	134	
173	1:1024	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	298	
174	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	73	
175	1:1024	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	51,3	343
176	1:1024													0	188
177	1:1024													117,6	
178	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	682,8	112
179	1:1024	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	121	
180	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	316
181	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	267
182	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	299,2	299
183	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	344

184	1:2048														181,2	
185	1:2048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	470,7	177	
186	1:2048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	11	
187	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	592,8	20	
188	1:2048	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	584,9	33	
189	1:2048	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	61,6	130	
190	1:2048	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		13	
191	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	114	
192	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		194	
193	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		199	
194	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		179	
195	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		271	
196	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		320	
197	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-		99	
198	1:2048	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-		15	
199	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35,2	207	
200	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52,3	320	
201	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	762,6		
202	1:2048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	147	
203	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		183	
204	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	145,1	287	
205	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	355,1	263	
206	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	614,8	271	
207	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		144	
208	1:2048	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		38	
209	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	73,5	170	
210	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	241,6	475	
211	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	124,5	369	
212	1:2048	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	559,8	176	
213	1:2048														133	
214	1:2048													338	26	
215	1:2048													32	379	
216	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
217	1:2048	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	104,5	287	
218	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		286	
219	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		269	
220	1:2048														197	
221	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		314	
222	1:2048														18	
223	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	381	154	
224	>1:2048	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	107,1	170	
225	>1:2048													0	239	
226	>1:2048														114	
227	>1:2048													336	140	
228	>1:2048	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	898,6	173	
229	>1:2048													350	248	
230	>1:2048	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		35	
231	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87,1	224	
232	>1:2048	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	212,2	119	
233	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	555	116	
234	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	111,4	222	
235	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		267	
236	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		244	
237	>1:2048	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	0	320	
238	>1:2048														243	
239	>1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		225	
240	>1:2048	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	88	296	
241	>1:2048	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-		322	
242	>1:2048														151	
243	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	685,6	243	
244	>1:2048	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	297,3	129	
245	>1:2048	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		159	
246	>1:2048	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	65,9	202	
247	>1:2048	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	108,1	37	
248	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	326	
249	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67,9	335	
250	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	419		
251	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	843	216	
252	>1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0	159	

253	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	307
254	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	69	
255	>1:2048													0	262
256	>1:2048													140,8	340
257	>1:2048	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	316,5	56
258	>1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	324	
259	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	688	414
260	>1:2048	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	346	
261	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	25,1	254
262	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
263	>1:2048	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	0	142
264	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	35,6	243
265	>1:2048													260,5	179
266	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	271,8	220
267	>1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1000	404
268	>1:2048	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	32	
269	>1:2048													0	

10.2 Zbirna tabela osnovnih kliničnih podatkov, koncentracije CIC-ov ($\mu\text{g/ml}$) in PLT ($\times 10^9/\text{l}$) PCR pozitivnih psov (+ prisoten; - odsoten; prazno polje – preiskava ni bila opravljena)

Zap.št	IFA	Klinični znaki											CIC	PLT
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		215
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	168,8	60
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	256,8	16
4	neg	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	455	114
5	neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	268,4	16
6	neg	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,4	
7	neg	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	555	122
8	1:128	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	495,4	273
9	1:512	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	425,2	23
10	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	434,7	11
11	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	536,8	192
12	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	210	
13	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	13
14	1:1024	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-		34
15	1:1024												431,7	11
16	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	361,3	185
17	1:1024	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	382,5	42
18	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		271
19	1:2048	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0	89
20	1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		204
21	1:2048													53
22	1:2048												87,6	44
23	>1:2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	200,2	133
24	>1:2048	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	0	55
25	>1:2048	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	370	8
26	>1:2048	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	231,7	27
27	>1:2048	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		187
28	>1:2048	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	134,7	364
29	>1:2048													46
30	>1:2048	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	327
31	>1:2048	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	948,8	192

10.3 Zbirna tabela osnovnih kliničnih podatkov, koncentracije CIC-ov ($\mu\text{g}/\text{ml}$) in PLT ($\times 10^9/\text{l}$) psov v kontrolni skupini (+ prisoten; - odsoten; prazno polje – preiskava ni bila opravljena)

Zap.št	Klinični znaki											CIC	PLT
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	82	340
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	158	339
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	225	343
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	143	346
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	140	341
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	130	344
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	310	349
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	27	339
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	75	339
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	168	343
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	105	335
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	343
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	275	339
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	140	338
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	45	347
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0	351
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	175	342
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	70	348
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	150	338

Legenda prilog:

1. **kosti, sklepi:** šepanje, težko vstajanje, hitro utrujanje, boleči in otečeni sklepi
2. **prebavila:** bruhanje, anoreksija, driska, obstipacija, povečano pitje, zmanjšano pitje,
osrednje živčevje: slabo ravnotežje, zanašanje, epileptiformni napadi, izguba zavesti,
3. paraliza
4. **krvavitve:** melena, hematurija, podplutbe, hematomi, krvavitev iz gobca
5. **koža:** srbež, bule, rane, edemi
6. **dihala:** kašelj, hropenje, sopenje
7. **sečila:** boleče področje ledvic, polakiurija, disurija, poliurija
8. **povišana temperatura**
9. **splošno:** oslabelost, hujšanje, apatija, tresenje
10. **onkologija:** limfom, hemangiosarkom, tumor mlečne žleze, tumor na črevesju
11. **brez kliničnih znakov**