

Erlihioze i anaplazmoze u pasa

Cerjan, Sandra

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:031114>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -](#)
[Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Sandra Cerjan

ERLIHIOZE I ANAPLAZMOZE U PASA

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom mentorice doc. dr. sc. Josipe Habuš.

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentorica: doc. dr. sc. Josipa Habuš

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Vilim Starešina
2. Doc. dr. sc. Suzana Hađina
3. Doc. dr. sc. Josipa Habuš
4. Prof. dr. sc. Zoran Milas (zamjena)

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Josipi Habuš na odabiru teme te na stručnom vodstvu i savjetima kojima mi je pomogla u izradi ovog rada.

Posebna zahvala ide mojoj obitelji na najvećoj podršci i strpljenju tijekom cijelog školovanja, bez njih studij ne bi bio moguć.

POPIS KRATICA

ALP (eng. alkaline phosphatase) = alkalna fosfataza

ALT (eng. alanine transaminase) = alanin-aminotransferaza

AST (engl. aspartate transaminase) = aspartat-aminotransferaza

DNA (engl. deoxyribonucleic acid) = deoksiribonukleinska kiselina

EDTA (eng. ethylenediaminetetraacetic acid) = etilendiamintetraoctena kiselina (antikoagulans)

ELISA (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) = imunoenzimni test

HGA = humana granulocitna anaplazmoza

HGE = humana granulocitna erlihioza

HME = humana monocitna erlihioza

IFA = indirektni imunofluorescentni test

IFN- γ = gama interferon

IgG = imunoglobulin G

IgM = imunoglobulin M

IV = intravenozno

PCR (engl. polymerase chain reaction) = lančana reakcija polimerazom

PO = peroralno

Pt = protutijela

q = svakih

RNA (engl. ribonucleic acid) = ribonukleinska kiselina

rRNA (engl. ribosomal ribonucleic acid) = ribosomska ribonukleinska kiselina

RT-PCR (engl. Reverse transcription polymerase chain reaction) = PCR u realnom vremenu

tid (engl. three times a day) = 3 puta dnevno

POPIS PRILOGA

Slika 1. Geografska proširenost *A. phagocytophilum*

Slika 2. Proširenost anaplazmoze u Europi

Slika 2. Proširenost erlihioze u Europi

Slika 4. Filogenijsko stablo porodice *Anaplasmataceae*, izrađeno na temelju filogenijske analize odsječaka 16S rRNA gena

Slika 5. Predloženi životni ciklus *Anaplasma phagocytophilum*

Slika 6. Globalna proširenost krpelja vrste *Ixodes scapularis*

Slika 7. Razvojni stadiji krpelja vrste *Ixodes scapularis*

Slika 8. Intracitoplazmatska morula i kokoidne uklopine *A. phagocytophilum* unutar neutrofila

Slika 9. Ulazak bakterije u stanicu i stvaranje morula

Slika 10. Klinička slika anaplazmoze u pasa

Slika 11. Ženka i mužjak krpelja vrste *Rhipicephalus sanguineus*

Slika 12. Uklopine *A. platys* u trombocitima

Slika 13. Životni ciklus smeđeg psećeg krpelja

Slika 14. *Rhipicephalus sanguineus* – razvojni stadiji

Slika 15. Klinička slika erlihioze u pasa

Slika 16. Klinički znakovi erlihioze na očima psa

Slika 17. Morula *E. canis* u makrofagu

Slika 18. Odrasli stadiji krpelja *Amblyomma americanum*

Slika 19. Morula unutar granulocita

Slika 20. *Ehrlichia canis*, morule unutar leukocita

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	2
2.1. Povijesni podaci.....	2
2.2. Geografska proširenost.....	4
2.3. Porodica <i>Anaplasmataceae</i>	7
2.4. Anaplazmoze.....	10
2.4.1. Granulocitna anaplazmoza pasa.....	11
2.4.1.1. Epizootiologija.....	11
2.4.1.2. Patogeneza.....	15
2.4.1.3. Klinička slika.....	18
2.4.1.4. Dijagnostika.....	20
2.4.1.5. Liječenje.....	22
2.4.1.6. Preventiva.....	22
2.4.1.7. Javno zdravstvo.....	23
2.4.2. Ciklička trombocitopenija u pasa.....	24
2.4.2.1. Epizootiologija.....	24
2.4.2.2. Patogeneza.....	25
2.4.2.3. Klinička slika.....	26
2.4.2.4. Dijagnostika.....	27
2.4.2.5. Liječenje.....	28
2.4.2.6. Preventiva.....	28
2.5. Erlihioze.....	29
2.5.1. Pseća monocitna erlihioza.....	30
2.5.1.1. Epizootiologija.....	30
2.5.1.2. Patogeneza.....	33

2.5.1.3. Klinička slika.....	34
2.5.1.4. Dijagnostika.....	37
2.5.1.5. Liječenje.....	41
2.5.1.6. Preventiva.....	42
2.5.1.7. Javno zdravstvo.....	43
2.5.2. <i>Ehrlichia ewingii</i>	44
2.5.2.1. Epizootiologija.....	44
2.5.2.2 Patogeneza.....	45
2.5.2.3. Klinička slika.....	46
2.5.2.4. Dijagnostika.....	47
2.5.2.5. Liječenje.....	47
2.5.2.6. Preventiva.....	48
2.5.2.7. Javno zdravstvo.....	48
2.5.3. <i>Ehrlichia chaffeensis</i>	49
2.5.3.1. Epizootiologija.....	49
2.5.3.2. Patogeneza.....	50
2.5.3.3. Klinička slika.....	51
2.5.3.4. Dijagnostika.....	52
2.5.3.5. Liječenje.....	52
2.5.3.6. Preventiva.....	52
2.5.3.7. Javno zdravstvo.....	53
3. ZAKLJUČCI.....	54
4. LITERATURA.....	58
5. SAŽETAK.....	63
6. SUMMARY.....	64
7. ŽIVOTOPIS.....	65

1. UVOD

Krpeljno prenosive bolesti predstavljaju veliki problem u veterinarskoj medicini, osobito u kućnih ljubimaca – pasa. Dokazano je da na postotak zdravstvenih problema u veterinarskih pacijenata, povezanih sa izloženosti krpeljima, otpada 15-21 % svih slučajeva (PROCAJLO i sur., 2011). Učestalost i proširenost krpeljno prenosivih bolesti povezane su sa klimatskim i okolišnim promjenama koje se događaju posljednjih 10 i više godina, a koje utječu na razvoj populacije krpelja i cirkulaciju uzročnika krpeljno prenosivih bolesti. Važan utjecaj na povećanje populacije krpelja imaju porast prosječnih temperatura u proljetnim mjesecima, raniji početak bujanja i procvat biljne vegetacije, povećana aktivnost čovjeka i pasa u prirodnom okolišu te povećanje brojnosti domaćina/rezervoara u okolišu (jeleni, mali sisavci, lisice, itd.). Zbog globalizacije, urbanizacije, globalnog zatopljenja, povećane trgovine i putovanja ljudi i životinja dolazi do prostornog širenja krpelja i njihovih patogena na područja gdje ih do tad nije bilo, odnosno koja nisu njihova primarna ekološka niša, što rezultira pojavom emergentnih bolesti kao što su erlihioza i anaplazmoza. Te bolesti uzrokuju ozbiljne kliničke simptome u pasa, a neke imaju i zoonotski potencijal s velikim utjecajem na javno zdravstvo. Povećan broj slučajeva emergentnih bolesti i novi patogeni uzročnici izazivaju veliku pažnju u Europi. Uporaba napredne tehnologije u molekularnoj biologiji mijenja način dijagnostike bolesti i uvelike olakšava prepoznavanje kliničkih slučajeva.

Zbog povećane pojavnosti i podizanja svijesti studenata veterine i veterinaru praktičara, odnosno boljeg razumijevanja ovih bolesti smatramo da je potrebno dati pregled dosadašnjih spoznaja o erlihiozama i anaplazmozama u pasa s posebnim naglaskom na bolesti prisutne u Republici Hrvatskoj. Stoga je cilj ovog rada objediniti najnovije spoznaje iz područja etiologije, epizootologije, patogeneze, kliničke slike, dijagnostike, liječenja i preventive ovih bolesti.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Povijesni podaci

Rod *Anaplasma* je 1910. godine prvi opisao Sir Arnold Theiler koji je tijekom svojeg istraživanja otkrio da su inkluzije vidljive na rubovima eritrocita anemičnih goveda zapravo uzročnici zasebne bolesti, a ne kako se do tada smatralo razvojni stadij različitih vrsta babezija. Uzročnika za kojeg je smatrao da zapravo pripada protozoama nazvao je *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910a, b; 1911). Nešto kasnije opisani su i slučajevi anaplazmoze u ovaca (1951. godine u Škotskoj), dok je infekcija u pasa prvi put zabilježena u Kaliforniji 1982. godine (SYKES, 2013). No tek otkrićem granulocitne anaplazmoze (HGA) u ljudi 1994. u Minnesoti i Wisconsinu započelo je intenzivno istraživanje ovih bakterija koje je rezultiralo reklasifikacijom i svrstavanjem do tada tri različita uzročnika (*E. equi*, *E. phagocytophilum* i uzročnika HGE) u vrstu nazvanu *Anaplasma phagocytophilum* (GREENE, 2006).

A. platys je opisana 1978. godine u Floridi (otkrili je Harvey i suradnici), kao bazofilna inkluzijska tjelešca u trombocitima trombocitopeničnih pasa (FERNANDES FERREIRA i sur., 2007). Bakterija je u početku opisana kao *Ehrlichia platys*, na temelju morfologije i unakrižne reaktivnosti s bakterijom *E. canis*. Sekvencioniranje i filogenetska analiza 16S rRNA gena pokazali su da je uzročnik povezan s *A. phagocytophilum* i *A. marginale*, što dovodi do posljedične reklasifikacije i preimenovanja u *A. platys* (DYACHENKO i sur., 2012).

Brojna otkrića u veterinarskoj medicini pridonijela su upoznavanju roda *Ehrlichia* te diferencijaciji roda *Ehrlichia* od roda *Rickettsia* i roda *Anaplasma* (CVETNIĆ, 2013).

E. canis je prvi put opisana 1935. godine u Alžiru no zanimanje za bolest povećalo se tek 1960-tih godina nakon izbijanja akutnog oblika erlihioze s visokom stopom smrtnosti među američkim vojnim psima u Vijetnamu. Bolest je prvotno nazvana tropska pseća pancitopenija, a kasnije je preimenovana u pseću monocitnu erlihiozu. Jedinu je dokazani uzročnik infekcije u pasa u Europi (SAINZ i sur., 2015).

E. ewingii je opisana 1971. godine kada se smatrala granulocitnim oblikom *E. canis*. 1992. godine, nakon amplifikacije i sekvencioniranja bakterijskog 16S rRNK gena iz krvi psa s granulocitnom erlihiozom, *E. ewingii* identificirana je kao zasebna vrsta, usko povezana s *E. canis* i *E. chaffeensis* (GREENE, 2006). Godine 1999. zabilježeno je da vrsta *E. ewingii*, koja uzrokuje granulomatoznu erlihiozu pasa, može uzrokovati humanu granulomatoznu erlihiozu (HGE) čovjeka.

Godine 1990. u Arkansasu je izdvojena iz krvi vojnika (u utvrdi Ford Chaffee) vrsta koja je nazvana *Ehrlichia chaffeensis*, a bolest koju je izazvala nazvana je humana monocitna erlihioza (HME) (CVETNIĆ, 2013).

2.2. Geografska proširenost

Infekcije erlihijama i anaplazmama pojavljuju se diljem svijeta, a njihova proširenost najviše će ovisiti o prisutnosti i gustoći njihovih krpeljnih vektora.

A. phagocytophilum javlja se u SAD-u, Južnoj Americi, Aziji, Rusiji, Africi te u europskim zemljama, u Ujedinjenom Kraljevstvu, Irskoj, Finskoj, Norveškoj, Švedskoj, Švicarskoj, Njemačkoj, Nizozemskoj, Poljskoj, Hrvatskoj i Sloveniji (Slika 1; Slika 2).

Infekcije *A. platys* zabilježene su po cijelom svijetu, s najvećom učestalošću u tropskim i suptropskim područjima. Bolest se javlja u Americi, Venezueli, na Srednjem Istoku (Izrael), u Aziji (Tajvan, Japan, Kina, Tajland), Australiji, Africi i Europi (BEAUFILS i sur., 2002), a opisan je i slučaj u Hrvatskoj (DYACHENKO i sur., 2012). U Europi se bolest pojavljuje osobito u mediteranskom području, uključujući Italiju, Španjolsku, Portugal, Francusku, Tursku, Grčku, Rumunjsku i Hrvatsku (SAINZ i sur., 2015)

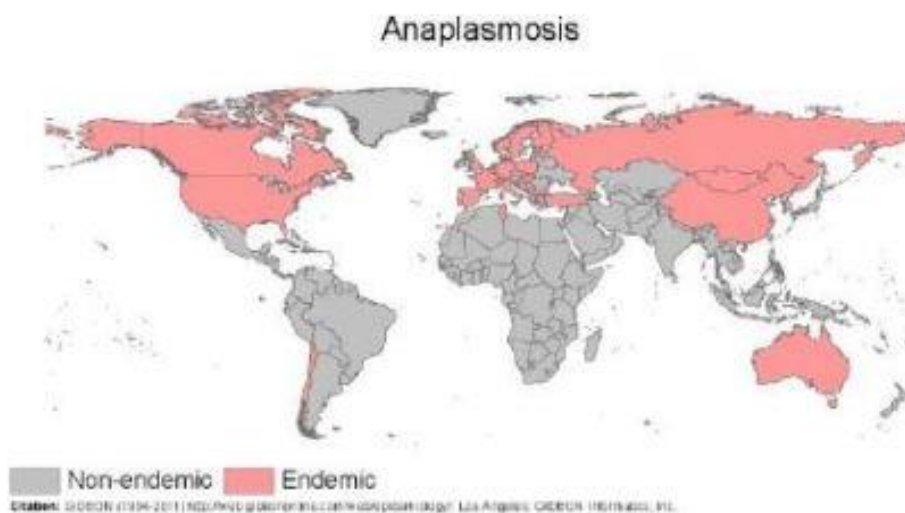
Infekcija *E. canis* zabilježena je širom svijeta (Amerika, Azija, Europa, Afrika). U Europi, sve mediteranske države smatraju se endemičnim područjem za *E. canis*, a neka istraživanja pokazala su da se bolest širi i na sjevernije države, kao što su Švicarska, Poljska i Njemačka (SAINZ i sur., 2015) (Slika 3).

E. chaffeensis prvotno je opisana u Sjevernoj Americi, a nedavno je dokazano da se javlja i u Južnoj Americi, Aziji i Africi. *E. ewingii* prisutna je u SAD-u, Africi i Brazilu.



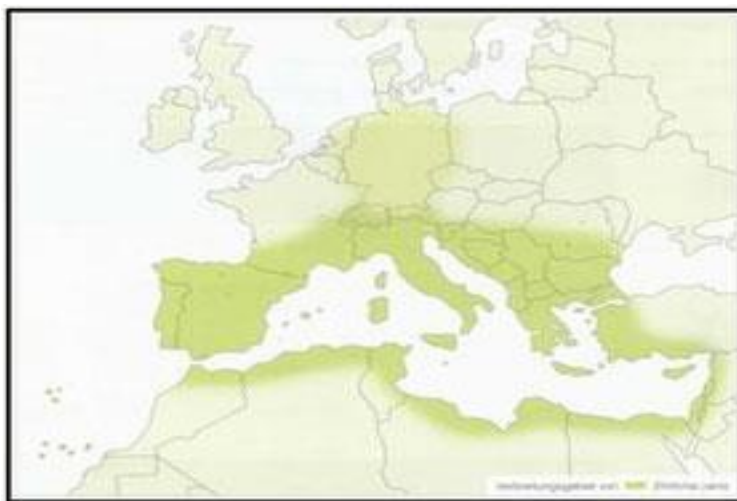
Slika 1. Geografska proširenost *A. phagocytophilum*.

(Izvor: <https://mygermanshepherd.org/wp-content/uploads/2011/08/Anaplasmosis.jpg>)



Slika 2. Proširenost anaplazmoze u Europi.

(Izvor: <https://www.vet-christnach.com/english/news/>)



Slika 3. Proširenost erlihioze u Europi.

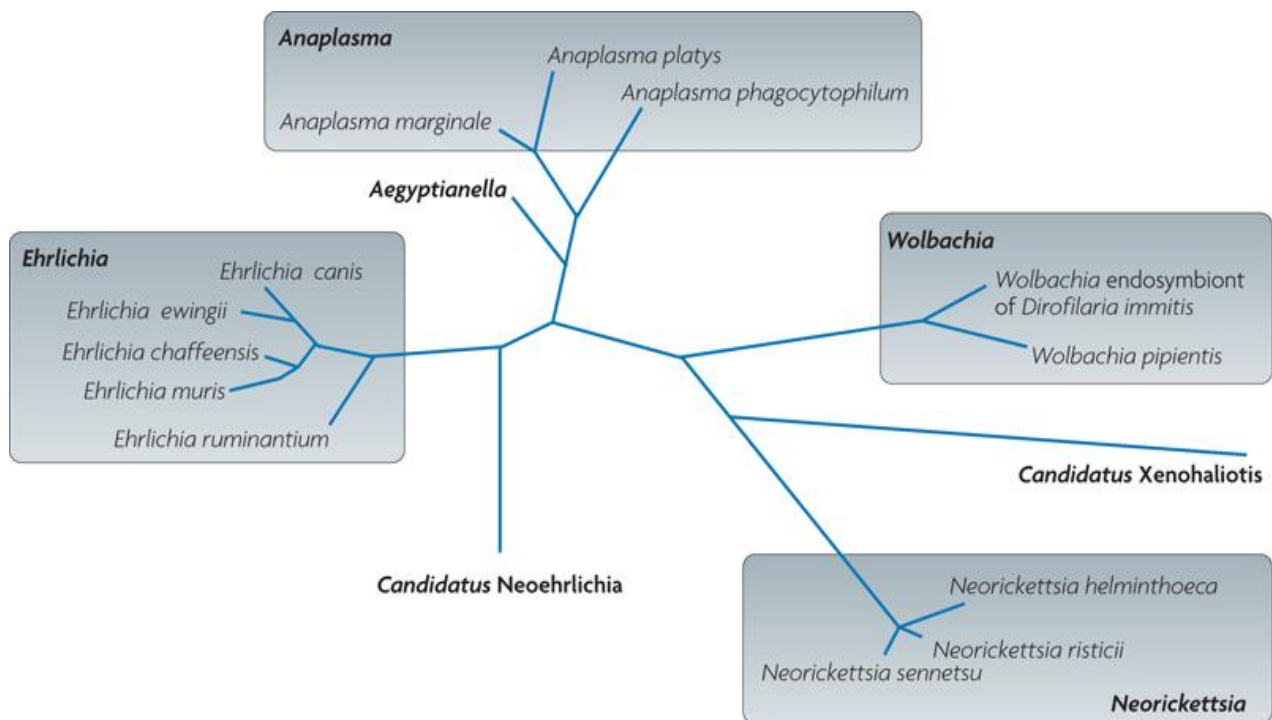
(Izvor: <https://www.vet-christnach.com/english/news/>)

2.3. Porodica *Anaplasmataceae*

Taksonomija bakterija iz porodice *Anaplasmataceae* mijenjala se kroz vrijeme. Tako su erlihije prvotno pripadale porodici *Rickettsiaceae*, rod *Ehrlichia*. Godine 2001. bakterije unutar porodica *Rickettsiaceae* i *Anaplasmataceae* podliježu reklasifikaciji temeljenoj na rezultatima filogenetske analize genskih sekvenci (molekularnoj analizi dvaju genomskih područja: bakterijske 16S rRNK i groESL genske sekvence). Rodovi *Ehrlichia* i *Wolbachia* premješteni su iz porodice *Rickettsiaceae* u porodicu *Anaplasmataceae*. Neke vrste erlihija prebačene su u rod *Neorickettsia*. Nova vrsta nazvana *Anaplasma phagocytophilum* danas obuhvaća 3 vrste koje su ranije bile poznate kao *Ehrlichia equi*, *E. phagocytophila* i uzročnik humane granulocitne erlihioze (HGE) (GREENE, 2006).

Kao rezultat reklasifikacije mijenjaju se i imena bolesti, te npr. pseća granulocitna erlihioza postaje pseća granulocitna anaplazmoza.

Porodica *Anaplasmataceae* danas sadrži 7 rodova: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia*, *Neoehrlichia*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella* i *Xenohaliotis* (Slika 4).



Nature Reviews | Microbiology

Slika 4. Filogenijsko stablo porodice *Anaplasmataceae*, izrađeno na temelju filogenijske analize odsječaka 16S rRNA gena.

(Izvor: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n5/fig_tab/nrmicro2318_F1.html)

Rod *Anaplasma* obuhvaća vrstu *A. phagocytophilum*, koja je infektivna za brojne vrste sisavaca uključujući i čovjeka, vrste *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis* i *A. ovis* koje su patogene za preživače, te vrstu *A. platys* koja je patogena za pse (CVETNIĆ, 2013).

Rod *Ehrlichia* obuhvaća vrste *E. canis*, *E. ewingii* i *E. chaffeensis* koje mogu inficirati ljude i pse, *E. muris* i *E. ruminantium* koje uzrokuju infekciju u miševa odnosno bolest vodenog srca u domaćih preživača.

Bakterije iz porodice *Anaplasmataceae* su obligatno unutarstanične alfa-proteobakterije koje inficiraju leukocite, trombocite, eritrocite i endotelne stanice. To su nepokretne, malene, pleomorfne, Gram negativne, obligatno aerobne bakterije. Za razliku od ostalih Gram negativnih bakterija one nemaju staničnu stjenku što ih čini iznimno osjetljivim na različite mehaničke čimbenike. Ne sintetiziraju peptidoglikane niti lipopolisaharide vanjske ovojnice (GREENE, 2006).

Bakterije iz rodova *Ehrlichia* i *Anaplasma* prenose se ubodom krpelja iz porodice *Ixodidae*, no povremeno se mogu prenijeti i drugim putovima, posebice tijekom medicinskih zahvata kao što su transfuzija krvi ili koštane srži. Postoje podaci o infekciji vrstom *E. chaffeensis* putem transplantacije organa.

2.4. ANAPLAZMOZE

Anaplazmoze su krpeljno prenosive bolesti, koje u pasa uzrokuju vrste *Anaplasma phagocytophilum* i *Anaplasma platys*. *Anaplasma phagocytophilum* uzročnik je granulocitne anaplazmoze u pasa, ljudi, konja, europskih domaćih preživača (ovce, koze, goveda) i kopitara. Inficirati se mogu i mačke, kamelidi, glodavci, ptice i ostale divlje životinje.

Anaplasma phagocytophilum najčešće inficira granulocyte (neutrofile, rijede eozinofile), u čijoj citoplazmi tvori vakuole u kojima se razmnožava. *A. phagocytophilum* nije genetski jedinstvena već su opisani brojni sojevi izdvojeni iz preživača, konja, pasa, mačaka, divljih cervida, ježeva, rakuna, itd. Krpelji koji prenose uzročnika pripadaju rodu *Ixodes*.

Anaplasma platys je uzročnik je pseće cikličke trombocitopenije. *Anaplasma platys* inficira trombocyte u kojima tvori bazofilne uklopine (morule), a prenosi ju krpelj *Rhipicephalus sanguineus*.

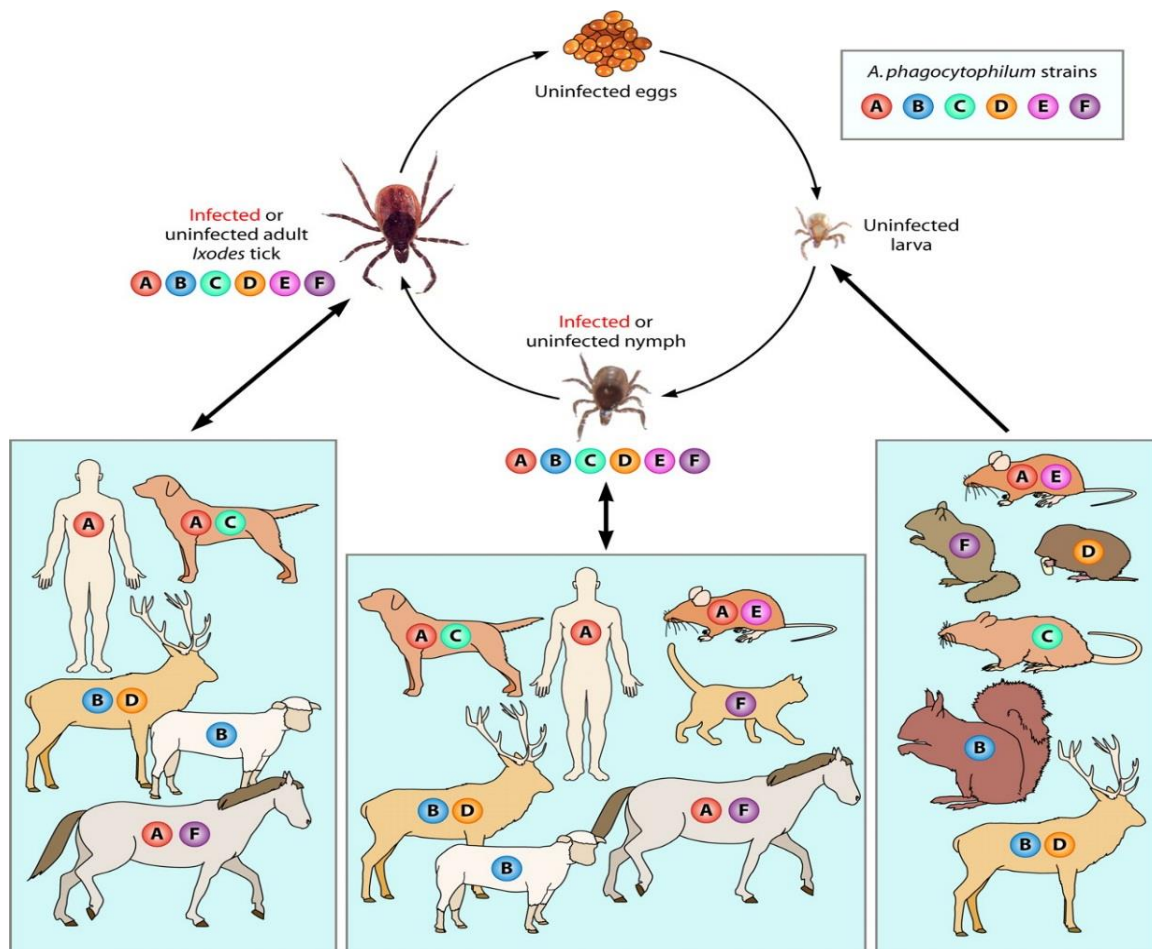
Klinička očitovanja ove dvije bolesti su prilično nespecifična, a relativno česte koinfekcije ostalim patogenima koje prenose iste ili različite vrste krpelja dodatno utječu na kliničku manifestaciju bolesti i otežavaju njihovu dijagnostiku.

2.4.1. Granulocitna anaplazmoza pasa

2.4.1.1. Epizootiologija

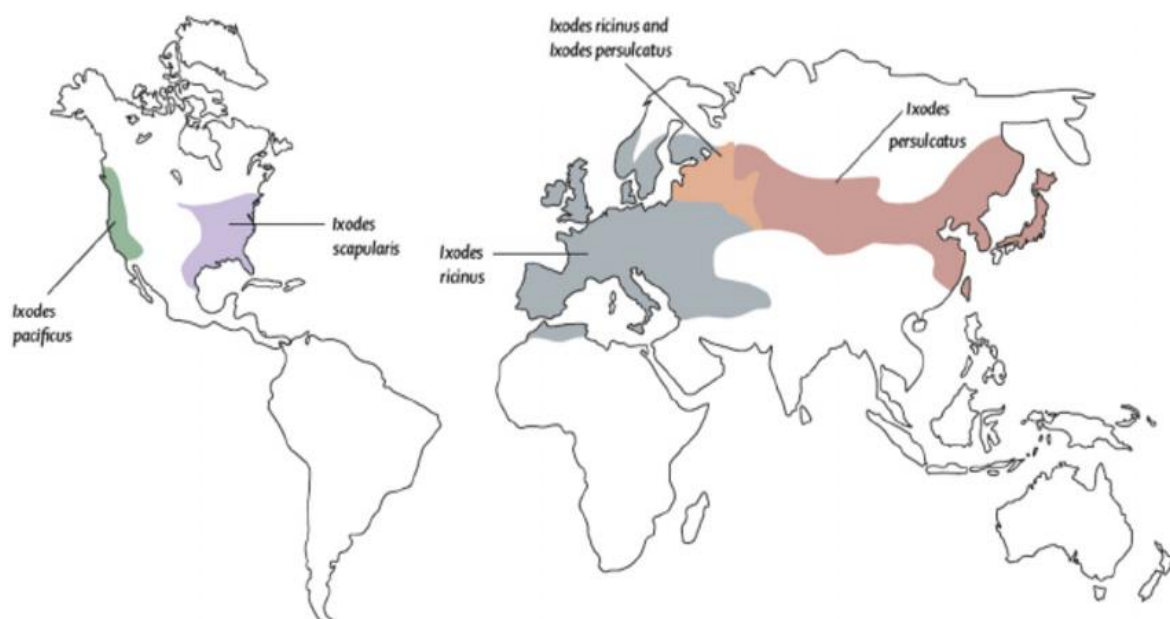
Veliki broj malih sisavaca i jelena navode se kao prirodni rezervoari *A. phagocytophilum* (Slika 5). U SAD-u rezervoare čine bjelonogi miš, tekunice, šumski štakor i sive vjeverice, dok su u Europi značajni rezervoari šumska voluharica, šumski miš, žutogrli miš, šumska rovka, srna i obični jelen (GREENE, 2006). Psi, mačke i ljudi slučajni su domaćini i nemaju važnu ulogu u prijenosu infekcije na ostale vrste.

Glavni vektori *A. phagocytophilum* su krpelji iz roda *Ixodes* (*I. persulcatus* kompleks). U središnjim i sjevernim dijelovima SAD-a to je *I. scapularis*, *Ixodes pacificus* u zapadnim dijelovima SAD-a, *Ixodes ricinus* u Europi te *Ixodes persulcatus* u Aziji (Slika 6). U populaciji krpelja uzročnik se prenosi transstadijski, s ličinke preko nimfe do odraslih oblika i svaki je razvojni stadij sposoban prenijeti uzročnika na novog nositelja (Slika 7). Ličinke krpelja hrane se na malim glodavcima i prenose anaplazme transstadijski na druge razvojne oblike. Prilikom sljedećeg hranjenja razvojni stadiji prenose uzročnika na druge životinjske vrste. Krpelji vrste *Ixodes scapularis* imaju veliku sposobnost prihvatanja na različite domaće i divlje životinje i čovjeka, a stanište su mu šuma i ruralna sredina (CVETNIĆ, 2013)



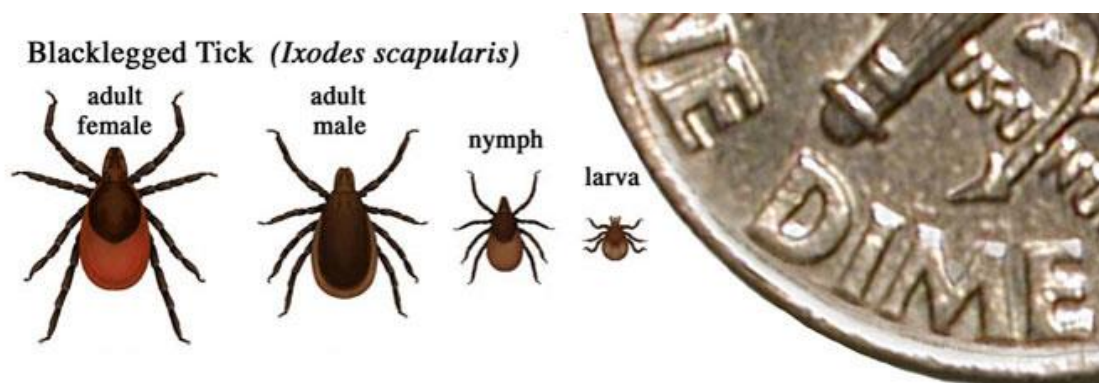
Slika 5. Predloženi životni ciklus *A. phagocytophilum*.

(Izvor: <http://cmr.asm.org/content/24/3/469/F2.expansion.html>)



Slika 6. Globalna proširenost krpelja vrste *Ixodes*.

(Izvor: https://www.researchgate.net/figure/282399119_fig3_Fig-3-Global-distribution-of-the-Ixodes-species-that-are-the-primary-vectors-for-Lyme)



Slika 7. Razvojni stadiji krpelja vrste *Ixodes scapularis*.

(Izvor: <https://www.cdc.gov/lyme/images/ixodeswcms.jpg>)

Iako rijetko, opisani su i prijenosi uzročnika drugim putovima. Najčešće takvi načini zaraze uključuju transfuziju krvi ili koštane srži. Prijenos krvlju moguć je samo tijekom bakterijemijske faze infekcije. Laboratorijski je dokazano da anaplazme u preparatima transfuzijske krvi u hladnjaku mogu preživjeti do tjedan dana. Moguća je transplacentalna infekcija, infekcija preko kontaminiranih igala. Nekoliko studija navodi i pojedinačne slučajeve infekcije vrlo neuobičajenim načinom npr. infekciju troje ljudi koje se inficiralo čisteći lešinu jelena ili moguću bolničku infekciju direktnim kontaktom zabilježenu kod radnika zdravstvene zaštite u Kini (GREENE, 2006).

Granulocitna anaplazmoza sezonska je bolest vezana uz aktivnost krpelja, javlja se u vrijeme najveće aktivnosti larvi i odraslih krpelja, u periodu kada je pojačan boravak ljudi i životinja na otvorenom. Pojavljuje se uglavnom između travnja i listopada, no mogući su i slučajevi u hladnije doba godine (zabilježen je slučaj u studenom) (SYKES, 2013).

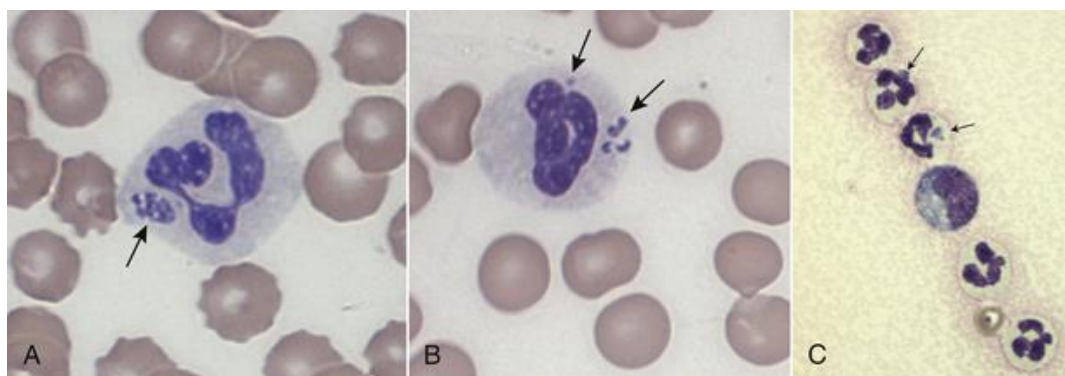
Broj seropozitivnih pasa raste sa starosti životinje zbog veće vjerojatnosti izloženosti infekciji tijekom vremena. Srednja dob pasa s kliničkim simptomima iznosi između 6 i 8 godina (od 6 mjeseci do 14 godina). Stvarna pasminska i spolna predispozicija nisu zabilježene. Ipak u određenim istraživanjima, zbog popularnosti pasmine, zlatni retriveri činili su gotovo polovicu inficiranih pasa (CARRADE i sur., 2009).

Rizični faktor za infekciju bakterijom *Anaplasma phagocytophilum* čini infekcija nekim drugim krpeljno prenosivim patogenom. Koinfekcije se javljaju zbog zajedničkih krpeljnih vektora, zbog većeg broja mogućih vektora ili oboje te posljedično tome kompliciraju kliničku sliku. Koinfekcije s bakterijom *Borrelia burgdorferi*, uzročnikom Lymške borelioze, česte su iz razloga što se *B. burgdorferi* prenosi istom vrstom *Ixodes* krpelja kao i *A. phagocytophilum* (SYKES, 2013). Među ostalim koinfekcijama spominju se one s bakterijama *Ehrlichia spp.*, *Bartonella spp.*, *Rickettsia spp.* i *Babesia spp.*

2.4.1.2. Patogeneza

A. phagocytophilum prenosi se ubodom krpelja. Da bi došlo do prijenosa uzročnika, krpelj mora biti prihvaćen za životinju i hraniti se minimalno 24 do 48 sati (GREENE, 2006).

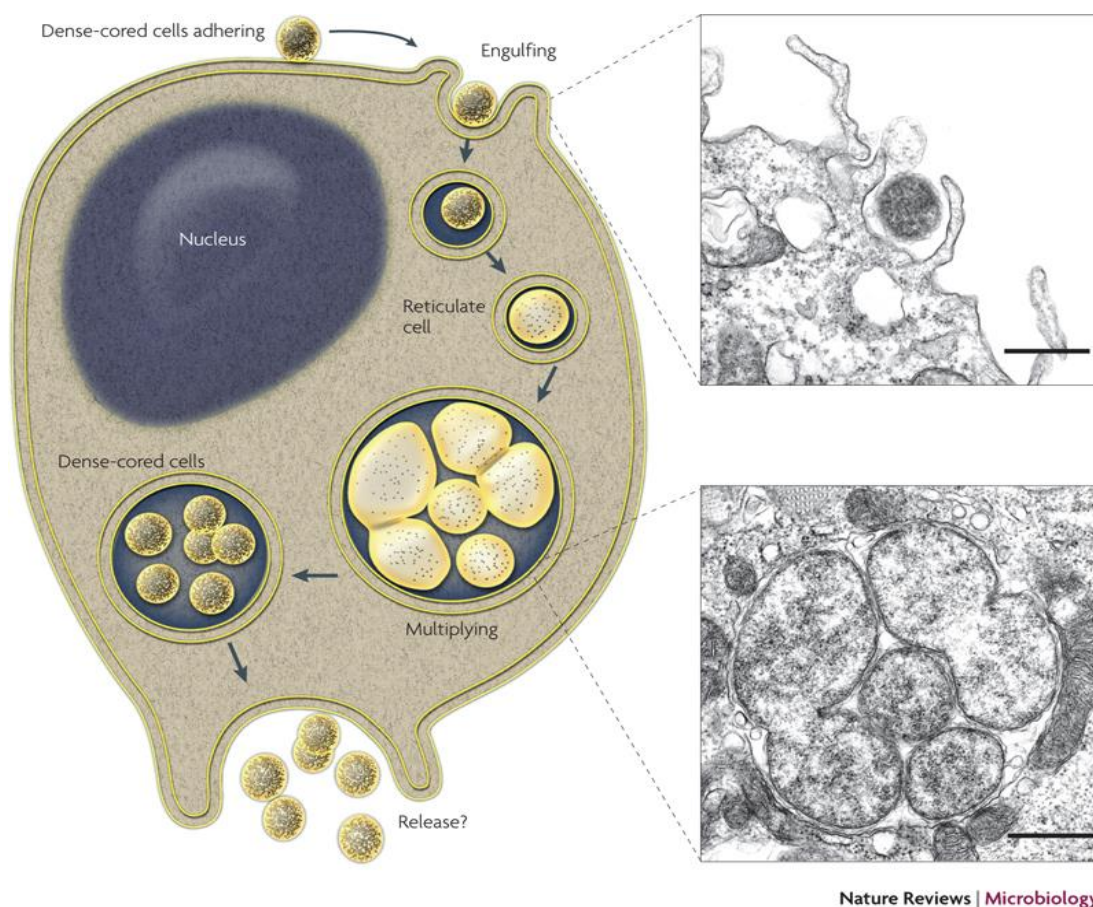
Nakon što mikroorganizmi uđu u krvni optjecaj prihvaćaju se za receptore na površini neutrofila, kao što je P-selektin glikoprotein ligand-1. Nakon prihvaćanja za receptore, mikroorganizmi ulaze u neutrofile procesom endocitoze preko kaveola uklopljeni u fagosom stanice. Bakterije preživljavaju u neutrofilu ometajući njihovu funkciju i izbjegavajući djelovanje fagolizosoma. Inhibiraju produkciju superoksida te smanjuju pokretljivost neutrofila i sposobnost fagocitoze. *A. phagocytophilum* također smanjuje prihvaćanje neutrofila za endotel i sprječava migraciju neutrofila u tkivo. U normalnim uvjetima, neutrofili cirkuliraju krvlju 10-12 sati prije nego uđu u tkivo i prolaze proces apoptoze. *A. phagocytophilum* inhibira spontanu apoptozu neutrofila, što omogućuje bakterijama da prežive dulji period unutar normalno kratko živućih neutrofila te im daje dovoljno vremena (> 24 sata p.i.) da stvore morulu (RIKIHISA, 2010). Osim neutrofila, *A. phagocytophilum* može inficirati i druge vrste stanica, kao što su stanice koštane srži, endotelne stanice i megakariociti (SYKES, 2013).



Slika 8. Intracitoplazmatska morula i kokoidne uklopine *A. phagocytophilum* unutar neutrofila

(Izvor: <http://veteriankey.com/anaplasmosis/>)

Unutar fagosoma bakterije se razmnožavaju procesom dvojne diobe (Slika 9), stvarajući pritom guste unutarstanične mikrokolonije, morule (Slika 8), koje izgledom podsjećaju na murvu (lat. *morus* = murva) (RIKIHISA, 2010).



Slika 9. Ulazak bakterije u stanicu i stvaranje morula.

(Izvor: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n5/fig_tab/nrmicro2318_F5.html)

Raspadom mrtve stanice nositelja uzročnici se oslobađaju u periferni krvotok i tkivo imunološkog sustava (slezena, jetra, koštana srž) te vrše invaziju novih stanica.

Za razliku od *Rickettsia spp.* i većine Gram negativnih bakterija anaplazme nemaju gene za sintezu lipopolisaharida i peptidoglikana koji aktiviraju leukocite. Stoga ove bakterije za izgradnju svoje membrane koriste kolesterol koji uzimaju od stanica, što im omogućava izbjegavanje odgovora imunološkog sustava domaćina (RIKIHISA, 2011).

Anaplazmoza je samoograničavajuća bolest u pasa i mačaka, s minimalnim letalitetom i kroničnom manifestacijom. Smatra se da su za kontrolu infekcije odgovorni povećana razina serumskih IFN- γ prvih 8-10 dana po infekciji, a nakon toga stanična i humoralna imunost (GREENE, 2006).

2.4.1.3. Klinička slika

Period inkubacije iznosi od 7-14 dana od ugriza krpelja i inokulacije uzročnika. Klinički simptomi i laboratorijski nalazi izrazito su varijabilni (Slika 10). Većina pasa inficiranih bakterijom *A. phagocytophilum* ne pokazuje nikakve kliničke znakove te bolest prolazi asimptomatski. Ukoliko dođe do kliničkog očitovanja najčešći klinički znakovi koji se pojavljuju su nespecifični, a mogu trajati tjedan ili više dana. To su: povišena temperatura ($39,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili $>$), letargija, inapetencija/anoreksija i depresija. Osim navedenih kliničkih znakova možemo uočiti i blijede sluznice te napet abdomen uz povraćanje i/ili proljev (SAINZ i sur., 2015). Zbog bolova u mišićima i imunoposredovanog poliartritisa životinja se otežano i nevoljko kreće, ukočena je, slaba i šepa. Katkad se javlja polidipsija, poliurija, blagi kašalj uz ubrzano disanje te blago ali generalizirano povećanje limfnih čvorova. Limfadenopatija i splenomegalija razvijaju se kao rezultat reaktivne limfoidne hiperplazije i istovremene ekstramedularne hematopoeze u slezeni. Rijetko se javljaju krvarenja u vidu petehija, melene ili epistakse, obično kod koinfekcije s drugim patogenima. Ponekad se mogu javiti neurološki znakovi poput ataksije, grčeva, kruženja, bolova u vratu i mentalne tuposti (SYKES, 2013). Infekcija bakterijom *A. phagocytophilum* može uzrokovati imunopatije, kao što je imunoposredovana trombocitopenija / anemija (SAINZ, i sur., 2015).

Najdosljednije odstupanje u laboratorijskom nalazu čini trombocitopenija, koja se pojavljuje u otprilike 90% pasa. Broj trombocita u trombocitopeničnih pasa kreće se između 5 000 i 164 000 trombocita/ μL . Trombocitopenija se uglavnom javlja kao posljedica pojačane destrukcije trombocita i stvaranja antitrombocitnih protutijela (imunoposredovani procesi). Osim trombocitopenije, javljaju se limfopenija/limfocitoza, blaga do umjerena neregenerativna ili regenerativna anemija, monocitopenija/monocitoza, neutrofilija/neutropenija, blaga hipoalbuminemija, hiperglobulinemija, blago povišeni jetreni enzimi (osobito ALP) i hiperbilirubinemija (CARRADE i sur., 2009).

Za sada još nije poznato da li prirodna infekcija osigurava doživotnu imunost u pasa (SAINZ i sur., 2015).



Slika 10. Klinička slika anaplazmoze u pasa: a) generalizirani ikterus, b) rotvajler s anemijom i neurološkim simptomima, c) terijer s anemijom, d) irski seter s očnom hiperemijom.

(Izvor: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682014000200005)

2.4.1.4. Dijagnostika

S obzirom na simptome koji mogu varirati u jačini i brojnosti i koji su često nespecifični te zbog učestalih koinfekcija, dijagnostika zna biti otežana. Sumnja na anaplazmozu postavlja se na temelju epizootioloških podataka, anamneze i kliničkih znakova, zajedno s karakterističnim promjenama u broju trombocita. Objektivne metode dijagnostike su nalaz morula u neutrofilima i kvantitativne serološke pretrage, no zbog smanjene osjetljivosti ovih metoda konačna dijagnoza najčešće se postavlja molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom (PCR).

Dijagnostičke kriterije za potvrdu humane granulocitne anaplazmoze čine klinička slika anaplazmoze i laboratorijski nalaz, zajedno s 1) identifikacijom morula unutar neutrofila (rjeđe eozinofila) pretragom obojenih krvnih razmaza u kombinaciji s jednostrukim pozitivnim titrom Pt za *A. phagocytophilum* (ili pozitivnim PCR testom), 2) četverostrukim porastom ili pad titra Pt unutar 4 tjedna, 3) pozitivnim rezultatima PCR testa koristeći specifične početnice za *A. phagocytophilum*, ili 4) izolacijom *A. phagocytophilum* iz krvi. Navedeni kriteriji mogu se primijeniti na psima i drugim vrstama životinja, međutim, kod životinja se izolacija uzročnika ne obavlja rutinski, već se koristi samo u istraživanjima (KOHN i sur., 2011.).

Mikroskopska pretraga obojenih krvnih razmaza i identifikacija morula unutar citoplazme neutrofilnih granulocita moguća je tijekom bakterijemijske faze, najranije 4 dana poslije inokulacije uzročnika, odnosno prvih tjedan dana po infekciji. Morule se pojavljuju u obliku tamnoplavih ili ljubičastih uklopina, a mogu se naći u 7-37 % cirkulirajućih neutrofila (GREENE, 2006). Morule koje tvore bakterije *A. phagocytophilum* mikroskopski se ne mogu razlikovati od onih koje tvore vrste iz roda *Ehrlichia*, stoga su serološke pretrage i PCR potrebni za potvrdu infekcije bakterijom *A. phagocytophilum* (SYKES, 2013).

Serološka testiranja potrebna su u slučajevima kada nema nalaza morula u perifernim neutrofilima i kada pretraga metodom PCR nije dostupna. Rabe se metode indirektne imunofluorescencije i imunoenzimni test. Na tržištu su prisutni i kombinirani (četiri uzročnika bolesti: erlihija, borelija, dirofilarija i anaplazma) brzi imunografski testovi. Protutijela se u serumu mogu utvrditi sedmog do desetog dana bolesti, a u cirkulaciji mogu perzistirati nekoliko mjeseci ili godina pa serološki pozitivan nalaz ne govori uvijek u prilog trenutnoj, akutnoj infekciji. Za dijagnostiku uvijek treba uzorkovati parne serume, a dokazom akutne infekcije smatramo nalaze u kojima je vidljiva serokonverzija ili četverostruki porast titra (GREENE, 2006).

Unakrižne reakcije između bakterija iz rodova *Anaplasma*, *Ehrlichia* i *Neorickettsia* mogu komplicirati konačnu dijagnozu, stoga je nužno da se serološke pretrage nadopune molekularnim pretragama, kao što su PCR i DNA sekvencioniranje (SAINZ i sur., 2015). Obično se jave unakrižne reakcije između vrsta iz roda *Anaplasma*, dok su unakrižne reakcije sa bakterijama iz roda *Ehrlichia* rijetke.

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je najosjetljivija dijagnostička metoda koja omogućuje specifičnu identifikaciju uzročnika u ranoj fazi bolesti. Za PCR dijagnostiku uzorkuje se periferna krv s dodatkom EDTA, buffy coat, koštana srž ili tkivo slezene. Uzorci krvi moraju se uzeti prije početka antibiotske terapije, a rezultati se procjenjuju u kombinaciji s nalazom titra Pt, kliničkim znakovima i odstupanjima u hematološko-biokemijskoj slici.

Uzgoj bakterija na staničnoj kulturi koristi se samo u istraživačke svrhe zbog svoje zahtjevnosti i trajanja (potrebno je 2-6 tjedana za dobivanje rezultata).

2.4.1.5. Liječenje

Anaplazmoza se obično liječi tetraciklinima, a lijek izbora u pasa je doksiciklin (5 mg/kg PO q12h), u trajanju od 2-3 tjedna. Učinkoviti su i rifampicin i levofloksacin, no zbog strogih smjernica donesenih zbog porasta antimikrobne rezistencije njihova se uporaba u pasa ne preporučuje.

Rano započeta terapija od presudnog je značenja. Većina pasa brzo reagira na terapiju te se klinička slika popravlja već 24-48 sati nakon početka liječenja. Psi sa težom kliničkom slikom zahtijevaju dulje liječenje, a oporavak može trajati mjesecima ili godinama.

Ukoliko se klinička slika ne popravi ili psi ne reagiraju na poduzeto liječenje doksiciklinom, preporučljivo je pretražiti ih na ostale infektivne ili bolesti sa sličnom kliničkom slikom (neoplazije ili imunoposredovane bolesti) (SAINZ i sur., 2015). Diferencijalnodijagnostički potrebno je isključiti erlihiozu, boreliozu i babeziozu (CVETNIĆ, 2013).

2.4.1.6. Preventiva

Preventivne mjere temelje se na kontroli krpelja te ukoliko je moguće na izbjegavanju endemskih područja (GREENE, 2006). Psi bi se preventivno trebalo tretirati protiv krpelja prije početka sezone (rano proljeće). Tretiranje pasa ektoparazitima mora se ponavljati tokom cijelog razdoblja rizika, sve do rujna ili kraja studenog, ovisno o klimatskom području. Danas, u Hrvatskoj smatramo da bi se repelenti trebali rabiti tijekom cijele godine. Ukoliko je došlo do prijanjanja krpelja na psa potrebno ga je što prije ukloniti da ne dođe do prijenosa uzročnika. Trenutno na tržištu ne postoji cjepivo protiv granulocitne anaplazmoze pasa.

2.4.1.7. Javno zdravstvo

Humana granulocitna anaplazmoza (HGA) prvi put je zabilježena 1994. u Minnesoti i Wisconsinu. Nakon toga zabilježeni su slučajevi u ostalim dijelovima SAD-a te u Sloveniji (GREENE, 2006). Bolesti su osobito podložne imunodeficientne osobe.

Najčešći klinički znakovi su povišena tjelesna temperatura, malaksalost, glavobolja i mijalgije. Nešto rjeđe javljaju se artralgije, povraćanje, proljev, kašalj, zbunjenost i ukočen vrat. U nekih bolesnika javlja se osip. Stopa smrtnosti za HGA iznosi 7-10% (CVETNIĆ, 2013), kao rezultat komplikacija oportunističkim infekcijama.

Dijagnoza bolesti postavlja se prema epidemiološkim i kliničkim podacima koje treba etiološki potvrditi, no terapija se ne smije odlagati zbog čekanja laboratorijskih nalaza ili zbog inicijalno negativnih rezultata. Laboratorijski nalaz pokazuje trombocitopeniju, leukopeniju i blagi porast serumske ALT i AST. Siguran dokaz bolesti nalaz je intracitoplazmatskih uklopina (morula), dokaz DNA uzročnika lančanom reakcijom polimeraze i serološko testiranje (indirektnom imunofluorescencijom).

Liječi se tetraciklinima, a učinkovita preventivna mjera jest izbjegavanje područja na kojima ima krpelja (CVETNIĆ, 2013), korištenje repelenata protiv krpelja, nošenje odgovarajuće odjeće i obuće i detaljni pregled cijelog tijela nakon boravka u prirodi u endemskim područjima te što ranije uklanjanje krpelja s tijela. Profilaksa antibioticima se ne preporuča.

2.4.2. Ciklička trombocitopenija u pasa

2.4.2.1. Epizootiologija

Puno je nepoznanica u epizootiologiji cikličke trombocitopenije pasa. Smatra se da je pas primarni domaćin *A. platys* (BREITSCHWERDT i sur., 2014). Infekcija najčešće prolazi klinički inaparentno ili je pak u svom kliničkom očitovanju vrlo blaga. Ipak, unutar mediteranskog bazena, opisani su i virulentniji sojevi koji su uzorkovali nešto teže kliničke oblike.

Pretpostavlja se da se prirodan prijenos uzročnika odvija preko vektora *Rhipicephalus sanguineus*, smeđeg psećeg krpelja (Slika 11). Navedeni krpelj vektor je i za druge patogene, kao što je npr. *Ehrlichia canis*, pa su koinfekcije česte. DNA uzročnika pronađena je i u drugim vrstama krpelja, kao što je npr. *Dermacentor auratus* na Tajlandu, *Rhipicephalus turanicus* u Izraelu te *Haemaphysalis spp.* i *Ixodes nipponensis* u Koreji.

Osim toga, dokazan je prijenos putem transfuzije krvi, stoga se PCR analiza krvi preporuča u endemskim područjima kako bi se osigurala sigurnost krvnih produkata (SAINZ i sur., 2015).

Pasminska, dobna i spolna predispozicija nisu opisane. Osim infekcije pasa zabilježene su i sporadične infekcije u mačaka i ljudi (SAINZ i sur., 2015).



Slika 11. Ženka (L) i mužjak (D) krpelja vrste *Rhipicephalus sanguineus*.

(Izvor: https://www.researchgate.net/figure/221806660_fig5_Figure-6-Brown-Dog-Tick-Rhipicephalus-sanguineus-female-L-male-R-Credit-R)

2.4.2.2. Patogeneza

Anaplasma platys ima izraženi afinitet prema trombocitima. Nakon što uđe u krvni optjecaj, uzročnik se prihvaća za površinu trombocita i ulazi u nj procesom endocitoze. U trombocitima se umnaža dvojnomo diobom, tvoreći pritom morule. Inficirani trombociti mogu sadržavati 1-3 vakuole okružene jednostrukom membranom, a svaka vakuola u sebi ima 1-15 organizama (GREENE, 2006). Najveći postotak inficiranih trombocita pojavljuje se tijekom početne septikemijske faze. Unutar nekoliko dana drastično se smanji broj trombocita te se uzročnik više ne vidi u krvi. Broj trombocita obično se spusti ispod 20 000/ μ L (GREENE, 2006). Nakon što se broj cirkulirajućih bakterija u krvi smanji, koncentracija trombocita se povisi unutar 3-4 dana. Takve epizode bakterijemije i trombocitopenije javljaju se u intervalima od 1-2 tjedna (SAINZ i sur., 2015).

Postotak inficiranih trombocita i težina trombocitopeničnih epizoda smanjuje se svakim idućim ciklusom parazitemije.

Dok se početna trombocitopenija može razviti primarno kao rezultat replikacije u trombocitima s posljedičnim razaranjem stanice, imunoposredovani mehanizmi uklanjanja trombocita smatraju se važnijima tijekom sljedećih epizoda trombocitopenije. Blaga normocitna normokromna anemija može se javiti prvih nekoliko mjeseci poslije infekcije. Prisutan je i blagi do umjereni porast proteina akutne faze i imunoglobulina te pad razine albumina u serumu (GREENE, 2006).

2.4.2.3. Klinička slika

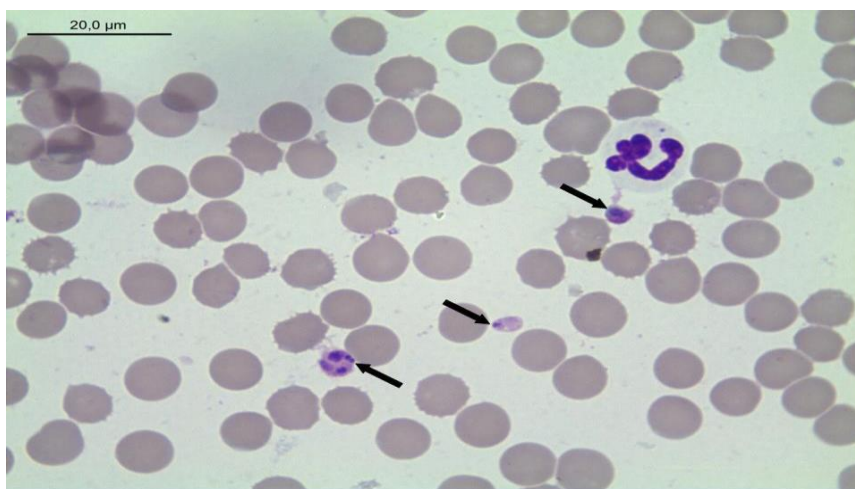
A. platys smatra se slabovirulentim uzročnikom koji je često povezan s ostalim infekcijama i bolestima. Većina pasa inficiranih bakterijom *A. platys* je klinički zdrava, bez ikakvih simptoma, s trombocitopenijom kao jedinim pokazateljem bolesti.

Eksperimentalno, klinički znakovi javljaju se između 8-14 dana nakon inokulacije uzročnika. Bolest može biti popraćena nespecifičnim i blagim kliničkim simptomima, koji uključuju anoreksiju, depresiju, generaliziranu limfadenopatiju, dok se u težim slučajevima mogu javiti i bljedilo sluznica, povišena rektalna temperatura, gubitak težine, purulentni iscjedak iz nosa, petehije i ekhimoze, epistaksa te uveitis (GREENE, 2006).

Smatra se da su sojevi *A. platys* u mediteranskom području patogeniji od ostalih sojeva pa uzrokuju i težu kliničku sliku. Koinfekcije s *E. canis* i ostalim patogenima mogu uzrokovati teži oblik bolesti i produljiti trajanje infekcije (SYKES i sur., 2013).

2.4.2.4. Dijagnostika

Zbog cikličke prirode bolesti, metoda identifikacije uzročnika u trombocitima svjetlosnim mikroskopom je otežana i uzročnici su obično slučajan nalaz. Nakon bojenja po Giemsi ili metilenskim modrilom vidimo ih u obliku bazofilnih uklopina u trombocitima (Slika 12). Organizmi su okruglog, ovalnog oblika graha, okružene dvostrukom membranom.



Slika 12. Uklopine *A. platys* u trombocitima.

(Izvor: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-49>)

Mali broj parazita u krvnom razmazu čini mikroskopsku metodu nepreciznom i nepouzdanom, osobito tijekom trombocitopenične faze (FERNANDES FERREIRA i sur., 2007). Veća osjetljivost metode moguća je tijekom početne faze infekcije (SAINZ i sur., 2015).

Od seroloških pretraga koriste se metoda indirektne imunofluorescencije i ELISA. Pozitivan rezultat na komercijalno dostupnim ELISA testovima ukazuje samo na prethodnu izloženost infekciji vrstom *Anaplasma*. Nedavno inficirani psi mogu biti seronegativni jer se Pt za *A. platys* ne mogu detektirati prvih 1-2 tjedna nakon inokulacije (SYKES i sur., 2013.).

Zbog unakrižnih seroloških reakcija između vrsta iz rodova *Ehrlichia* i *Anaplasma*, serološka testiranja moraju se upotpuniti molekularnim metodama dijagnostike (PCR, sekvencioniranje DNA).

PCR i RT-PCR koriste se za dokaz DNA uzročnika i konačnu potvrdu infekcije. U odsutnosti nalaza morule u trombocitima, molekularne metode dijagnostike jedini su način utvrđivanja akutne infekcije.

2.4.2.5. Liječenje

Infekcije s *A. platys* liječe se tetraciklinima (doksiciklin 5-10 mg/kg, q12-24h, 8-10 dana) i enrofloksacinom (5mg/kg, q12h, 14-21 dan). Trombocitopenija u pasa obično nestaje tjedan dana nakon početka terapije (SAINZ i sur., 2015).

2.4.2.6. Preventiva

Profilaksa se temelji na adekvatnoj kontroli vektora, izbjegavanju područja gdje ima krpelja te korištenjem odgovarajućih sredstva protiv krpelja tijekom cijele sezone aktivnosti krpelja. Cjepivo ne postoji.

2.5. ERLIHIOZE

Erlihioza je multisistemska zarazna bolest uzrokovana malim unutarstaničnim bakterijama iz roda *Ehrlichia*, koja se u posljednje vrijeme često spominje kako u ljudi tako i u životinja. Etiološki uzročnici erlihioze trenutno su klasificirani u red *Rickettsiales*, koji je nastao na temelju reorganizacije porodica *Rickettsiaceae* i *Anaplasmataceae*, rod *Ehrlichia*. Rod *Ehrlichia* čini 5 poznatih vrsta bakterija: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris* i *Ehrlichia ruminantium* (GREENE, 2006). Ti mikroorganizmi poznati su kao etiološki uzročnici infekcija ljudi i različitih vrsta životinja diljem svijeta. Njihova prisutnost dokazana je u krvi glodavaca, konja, goveda, ovaca, koza, lisica i pasa. Unatoč čestoj pojavi kod životinja, intenzivno istraživanje erlihioze počelo je tek nakon pojave infekcije u ljudi. Rezultati tih istraživanja dovode do promjene u sistematici tih bakterija, dobivamo bolju spoznaju o detaljima patogenosti i epidemiologiji infekcija koje uzrokuju, a dijagnostičkih postupci koji se koriste za potvrdu erlihioze u humanoj i veterinarskoj medicini se usavršavaju (PROCAJLO i sur., 2011).

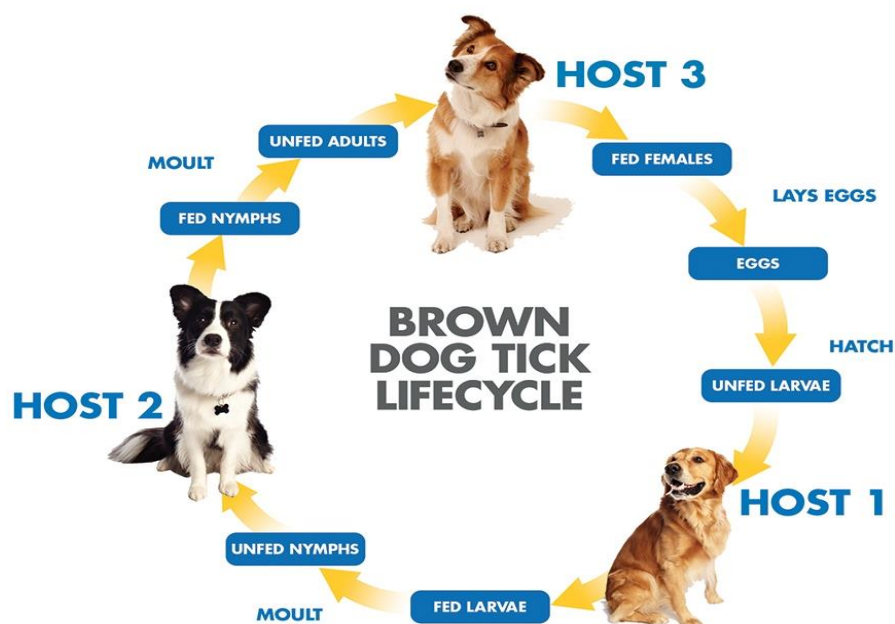
Erlihiozu u pasa uzrokuje nekoliko vrsta erlihija koje napadaju različite grupe krvnih stanica. Bolest najčešće uzrokuje vrsta *Ehrlichia canis* s tropizmom prema monocitima te nešto rjeđe *E. chaffeensis* koja također inficira monocite i *E. ewingii* koja ima tropizam prema granulocitima. *E. chaffeensis* i *E. ewingii* su zoonoze te, osim u pasa, uzrokuju bolest i u ljudi, dok se *E. canis* rijetko povezuje sa infekcijom u ljudi. Do sad je u Hrvatskoj opisano nekoliko slučajeva bolesti u pasa (BEDRICA i MARINCULIĆ, 2006).

2.5.1. Pseća monocitna erlihioza

2.5.1.1. Epizootiologija

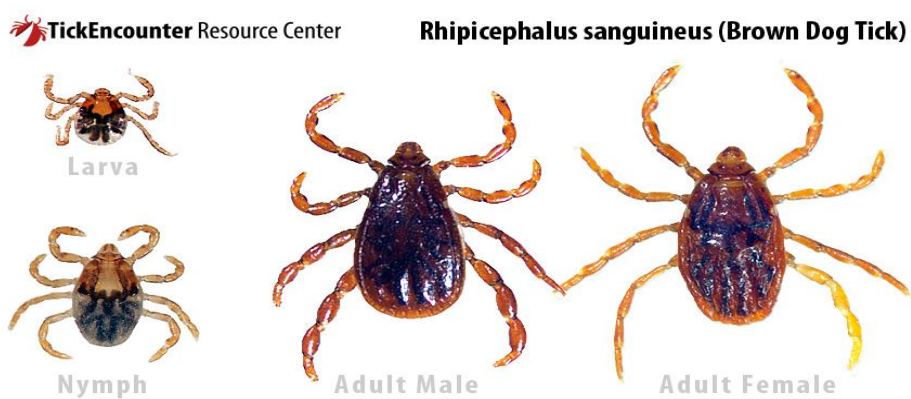
Bakterija *Ehrlichia canis* jedan je od uzročnika pseće monocitne erlihioze. Bolest je u literaturi poznata i kao pancitopenija pasa, pseći tifus, hemoragijska groznica pasa, idiopatski hemoragijski sindrom, nairobijski poremećaj krvarenja i rikecioza pasa (BEDRICA i MARINCULIĆ, 2006).

Smeđi pseći krpelj ili kućni krpelj *Rhipicephalus sanguineus*, koji se smatra jednim od najraširenijih krpelja u svijetu, glavni je prijenosnik uzročnika bolesti. Krpelji se zaraze sisanjem krvi akutno inficiranih pasa, tijekom prva 2-3 tjedna infekcije kada je i broj zaraženih leukocita najveći (BEDRICA i MARINCULIĆ, 2006). Životni ciklus smeđeg psećeg krpelja sličan je kao i kod ostalih vrsta krpelja iz porodice *Ixodidae*. Ženke se nakon parenja i sisanja krvi otpuštaju s domaćina da bi položile jaja. Za razliku od ostalih vrsta krpelja koji zahtijevaju biljke ili tlo za polaganje jaja, ženke smeđeg psećeg krpelja sposobne su poleći tisuće jaja na bilo kojoj dostupnoj površini, u namještaju, u pukotinama u kućama, garažama, stazama, psećim kućicama. Da bi se dovršio razvoj, potreban je minimalno jedan krvni obrok u svakoj fazi ciklusa krpelja. Smatra se da je njihov životni ciklus trodomaćinski (Slika 13), što znači da se hrane na tri različita domaćina te napuštaju domaćina nakon krvnog obroka prije svake njihove razvojne faze (Slika 14). Svaka faza mora pronaći svog domaćina. Zbog svoje specifičnosti da cijeli životni ciklus može provesti u zatvorenom (stanovi, kuće, pseće kućice), smeđi pseći krpelj može ostati s jednim domaćinom tijekom svog života (jednodomaćinski životni ciklus). S obzirom na stalno dostupan krvni obrok u takvom okruženju, osobito ako psima nije omogućena odgovarajuća zaštita, populacija krpelja može se jako brzo povećati, do nekoliko stotina krpelja po životinji (SAINZ i sur., 2013).



Slika 13. Životni ciklus smeđeg psećeg krpelja.

(Izvor: <http://www.frontlineplus.com.au/FleasTicksWorms/Pages/ftw-ticks-protectfrombrowndogticks.aspx>)



Slika 14. *Rhipicephalus sanguineus* – razvojni stadiji.

(Izvor: http://www.tickencounter.org/tick_identification/brown_dog_tick)

Krpelji na psu imaju sklonost grupiranja omogućujući tako prijenos mikroorganizama sa zaraženih krpelja na nezaražene. Kompletan razvoj erlihija odvija se u krpelju, a krpelj može prenijeti infekciju psima i do 155 dana nakon što sam bude zaražen (GREENE, 2006). To omogućava uzročniku da prezimi u krpelju i infekciju na psa prenese tek iduće proljeće.

Krpelji preferiraju toplija i vlažnija klimatska područja. U zemljama s umjerenom klimom javljaju se u travnju, iščezavaju u rujnu, a prezimiti mogu u svim razvojnim stadijima. Za aktivnost krpelja vrlo su važne temperatura i vlažnost zbog čega imaju sezonsku aktivnost – najbrojniji i najaktivniji su u proljeće i početkom ljeta. Mogu se susresti i u jesen, ali znatno rjeđe. Posljedično tome i akutni oblik bolesti najčešće je zabilježen u toplijim mjesecima, zbog veće aktivnosti krpeljnog vektora, no zbog produženog perioda supkliničkog stadija kroničnu erlihiozu možemo zabilježiti u bilo koje doba godine (MERCK, 2010).

Nedavna studija ukazuje da je prijenos *E. canis* moguć već 3 sata nakon što se krpelj prihvati za psa (SAINZ i sur., 2015). Osim krpeljom bolest se može prenijeti i transfuzijom krvi zaraženog psa (MERCK, 2010).

Osim pasa, inficirati se mogu i divlji kanidi (kojoti, lisice, vukovi, šakali) koji su rezervoari uzročnika u divljoj prirodi. Iako je prirodna infekcija mačke opisana u Sjevernoj Americi, klinički slučajevi erlihioze rijetko su zabilježeni (SYKES, 2013). Sve pasmine pasa prijemljive su za infekciju, no smatra se da su pasmine njemački ovčar i sibirski haski predisponirane za razvoj težih kliničkih znakova erlihioze odnosno kroničnih oblika bolesti praćenih lošijom prognozom. Dobna i spolna predispozicija za infekciju nisu dokazane (SAINZ i sur.).

Česte su koinfekcije s bakterijom *Anaplasma platys* iz razloga što krpelj *Rhipicephalus sanguineus* predstavlja zajedničkog vektora za oba uzročnika bolesti.

2.5.1.2. Patogeneza

E. canis ima afinitet prema mononuklearnim stanicama. Uzročnik se u inficiranim stanicama umnaža dvojnomo diobom unutar vakuola, a ruptura inficiranih monocita dovodi do izlaska erlihija i infekcije novih stanica (SYKES, 2013). Erlihije, kao i ostali pripadnici porodice *Anaplasmataceae* ne posjeduju enzime za sintezu peptidoglikana i lipopolisaharida što olakšava izbjegavanje imunološkog odgovora i produženo intraleukocitnom preživaljavanje.

Bolest se razvija u tri stadija; akutnom, supkliničkom i kroničnom. Akutni stadij može trajati 2-4 tjedna, tijekom kojih se erlihije intenzivno šire po organizmu. U neliječenih životinja ili onih kod kojih liječenje nije bilo pravilno i/ili potpuno može doći do spontanog povlačenja kliničkih simptoma. Ovakve životinje predstavljaju tzv. zdrave kliconoše, a erlihije se, najčešće u slezeni, takvih životinja mogu zadržati i nekoliko mjeseci do godine dana. Tijekom tog vremena jedini patološki nalaz kojeg u pasa možemo naći je trombocitopenija. Psi u supkliničkom stadiju bolesti mogu ili uspjeti eliminirati erlihije iz organizma ili pak, zbog za sada još nerazjašnjenih uzroka, bolest prelazi u kronični stadij. Tijekom kroničnog stadija dolazi do hipoplazije koštane srži i posljedične pancitopenije. Hematološke promjene različite su, a javljaju se kao posljedica upalnih i imunoloških procesa. Tako je npr. trombocitopenija jedan od najkonzistentijih nalaza u svim stadijima bolesti, a smatra se da do nje dolazi zbog povećanog utroška, skraćenog poluživota, stvaranja antitrombocitnih Pt, a dokazano je da serum inficiranih pasa sadržava topivi faktor koji koči migraciju trombocita.

Infekcija *E. canis* očituje se jakom invazijom parenhimnih organa s perivaskularnim nakupljanjem plazma-stanica, osobito u plućima, moždanim ovojnicama, slezeni i bubrezima (CVETNIĆ, 2013).

2.5.1.3. Klinička slika

Klinička slika erlihioze u pasa je različita i vrlo često atipična, može varirati od asimptomatske infekcije do teške, kronične bolesti, ovisno o soju uzročnika, imunološkom odgovoru psa i prisutnosti drugih bolesti. Unatoč nedostatku kliničkih znakova, mikroorganizmi se mogu nalaziti u organizmu zaraženog psa mjesecima pa čak i godinama, neprestano potičući imunološki sustav psa što se jasno prikazuje kroz visoki titar stvorenih protutijela (PROCALO i sur., 2011). Konkurentne infekcije drugim mikroorganizmima mogu utjecati na težinu i ishod bolesti. Ipak, općenito se smatra da infekcija bakterijom *E. canis* ipak uzrokuje puno teže kliničke oblike od infekcije anaplazmama (SAINZ i sur., 2015).

Eksperimentalno je dokazano da inkubacija iznosi 8-20 dana, a bolest se javlja u tri osnovna oblika: akutnom, supkliničkom i kroničnim obliku bolesti. Ipak, potrebno je napomenuti da ćemo kod prirodnih infekcija vrlo teško utvrditi da li se naš pacijent nalazi u akutnom ili kroničnom stadiju bolesti (BEDRICA i MARINCULIĆ, 2006).

Tijekom akutnog stadija dolazi do pojave nespecifičnih znakova bolesti. Bolest obično počinje naglim porastom tjelesne temperature ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), slabošću i apatijom. Ovim simptomima mogu se pridružiti progresivni gubitak tjelesne težine, blago šepanje i nevoljkost, životinja se odbija pomaknuti zbog artritisa i bolova u koštano-mišićnom sustavu. Mogu se pojaviti i respiratorni simptomi: dispneja, mukopurulentni iscjedak iz nosa i konjunktiva i intersticijska pneumonija. Neki autori opisuju neurološke poremećaje: ataksiju, tremor glave i simptome nalik epilepsiji. Najkarakterističniji poremećaji ove faze su poremećaji u hemostazi koji rezultiraju pojavom krvarenja (krvarenje iz nosa, na mjestu ubodnih rana, u prednjoj očnoj sobici, prisutnost krvi u urinu i fecesu, petehije, ekhimoze) (Slika 15). Životinja može imati povećane limfne čvorove i splenomegaliju. Tipični laboratorijski nalaz uključuje trombocitopeniju, koja je posljedica autoimune reakcije, blagu leukopeniju i anemiju. Većina pasa preživi akutni napad i ozdravi uz odgovarajuću terapiju, a neliječeni ili neadekvatno terapiрани mogu uginuti zbog teške progresivne koagulopatije ili nakon 4-6 tjedana prelaze u supklinički ili kronični oblik bolesti (PROCAJLO i sur., 2011).

Supklinički oblik može trajati mjesecima ili čak godinama, a dokazano je da psi u ovoj fazi godinama mogu nositi uzročnika u svojoj slezeni (GREENE, 2006). Ova faza pretežno se očituje promjenama u krvnoj slici, dok su psi naizgled klinički zdravi. Laboratorijskom pretragom nalazimo trombocitopeniju i hiperglobulinemiju. Titar serumskih Pt drastično je povećan (BEDRICA i MARINCULIĆ, 2006). U pasa sa zdravim imunosnim sustavom uzročnik se ubrzo uklanja iz organizma, dok u slabo imunih pasa bolest redovito prelazi u kronični oblik.

Prema simptomima koji se javljaju, kronična faza može biti srednjeg ili jakog intenziteta. Ako se radi o bolesti srednjeg intenziteta, simptomi su obično blaži i nespecifični, a mogu trajati do 5 godina (PROCALO i sur., 2011). Teški oblik kronične faze javlja se obično nakon kratkog supkliničkog razdoblja ili vrlo kratke kronične faze srednjeg intenziteta. Na intenzitet kronične faze utječu razni faktori kao što su: uvjeti držanja, starost i imunokompetentnost, prisutnost drugih krvnih parazita ili hematoloških bolesti (BEDRICA i MARINCULIĆ, 2006). Ova faza bolesti karakterizirana je hipoplazijom koštane srži i posljedičnom pancitopenijom te infiltracijom limfocita i plazma-stanica u različite organe. Klinička slika ovisi o organu koji je zahvaćen, a simptomi su često teži od onih koji se pojavljuju u akutnoj fazi.

Najčešće se javljaju nespecifični klinički znakovi: depresija, letargija, blagi gubitak tjelesne težine i anoreksija. Često se javljaju poremećaji krvarenja koji rezultiraju blijedilom sluznica, petehijama i/ili ekhimoza po koži i sluznicama, epsitaksom, hematurijom i melenom.

Mogu se razviti brojni očni simptomi, kao što su: uveitis, korioretinitis, upala i krvarenje mrežnice, retinalni perivaskularni infiltrat i odvajanje mrežnice, koji mogu uzrokovati sljepoću (Slika 16).

U manjeg broja pasa neurološki znakovi javljaju se kao rezultat oštećenja tkiva središnjeg i perifernog živčanog sustava. Opisani su slučajevi ataksije sa disfunkcijom gornjih ili donjih motornih neurona, stupor, vestibularni sindrom, anizokorija, cerebelarna disfunkcija, parapareza ili tetrapareza, tremor, generalizirana ili lokalizirana hiperestezija, nistagmus.

Kod nekih pasa dolazi do poliartropatije. Bolesti zglobova razvijaju se kao rezultat odlaganja imunoloških kompleksa s posljedičnim artritisom i upalnim infiltratom u zglobovima (SYKES, 2013). Od ostalih komplikacija spominju se nefropatije, intersticijska pneumonija, endokarditis, bolesti jetre i polimiozitis te difuzna atrofija mišića. Od reproduktivnih poremećaja zabilježeni su produženo krvarenje u estrusu, jalovost, pobačaji i smrt novorođenčadi. Kronična erlihioza može biti fatalna.



Slika 15. Klinička slika erlihioze pasa.

(Izvor: <http://www.scielo.org.co/img/revistas/mvz/v19n2/vol19n1a5f3.jpg>)



Slika 16. Klinički znakovi erlihioze na očima psa.

(Izvor:

[https://www.researchgate.net/publication/6383854 Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis Ehrlichia canis A retrospective study of 90 cases](https://www.researchgate.net/publication/6383854_Ocular_manifestations_of_natural_canine_monocytic_ehrlichiosis_Ehrlichia_canis_A_retrospective_study_of_90_cases))

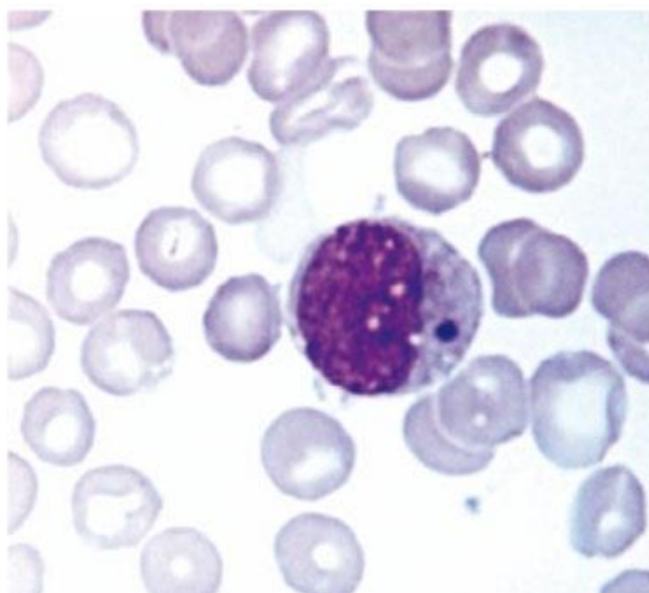
Promjene u krvnoj slici najčešće su prvi pokazatelji bolesti i uključuju trombocitopeniju, neregenerativnu anemiju i leukopeniju. Pancitopenija se javlja kao rezultat hipoplazije koštane srži (GREENE, 2006). Anemija u akutnoj fazi potječe od pojačane razgradnje (na imunološkoj osnovi) i smanjene proizvodnje eritrocita. U ovoj fazi bolesti histološki nalazimo i eritrofagocitozu. Anemija u kroničnoj fazi najčešće je neregenerativna i rezultat je stalnog razaranja eritrocita, učestalih krvarenja i smanjene proizvodnje eritrocita uzrokovane hipoplazijom koštane srži. Broj leukocita je vrlo promjenjiv pa se ne smatra patognomoničnom odrednicom. Plazmacitoza koštane srži smatra se tipičnim nalazom kod većine pasa inficiranih bakterijom *E. canis*.

Biokemijskom pretragom krvi može se dokazati hiperproteinemija s hiperglobulinemijom i hipoalbuminemijom, povišena vrijednost bilirubina, ALT-a i ALP-a., te povišene vrijednosti ureje i kreatinina. Vrijeme krvarenja obično je produženo unatoč normalnim vrijednostima protrombina, protrombinskog vremena i proizvoda razgradnje fibrina ((BEDRICA i MARINCULIĆ, 2006).

2.5.1.4. Dijagnostika

Dijagnostika erlihioze u pasa može biti otežana, pogotovo ako se javlja u područjima gdje se bolest još nije pojavila odnosno nije dijagnosticirana. Klinička slika je obično nespecifična te često nije popraćena karakterističnim simptomima kao što su sklonost krvarenju ili šepanje. Dodatni problem predstavlja činjenica da se tijekom erlihioze mijenja ovisno o geografskom području. To je razlog da se sumnja na monocitnu erlihiozu pasa postavlja se na temelju anamneze i epizootioloških podataka zajedno sa složenim mikroskopskim, hematološkim, biokemijskim, serološkim i molekularnim ispitivanjima (PROCAJLO i sur., 2011).

Najjednostavnija metoda dijagnostike erlihioze je mikroskopski pregled obojenih krvnih razmaza. Nalaz tamnoljubičasto obojenih kokoidnih bakterija (morula) u krvnom razmazu javlja se samo u 4-6% kliničkih slučajeva, i to u akutnoj fazi infekcije (Slika 17). Veća mogućnost nalaza morula može se ostvariti citološkom pretragom aspirata limfnih čvorova (SAINZ i sur., 2015). U nekim slučajevima moguć je nalaz morule u cerebrospinalnoj tekućini. S obzirom na nisku osjetljivost metode, mora se obaviti daljnja dijagnostika koja uključuje serologiju i molekularne metode (PCR).



Slika 17. Morula *E. canis* u makrofagu.

(Izvor: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612011000100002)

Prilično je pouzdana imunološka dijagnoza dokazom Pt (IgM, IgG) u krvnom serumu oboljelih pasa pomoću indirektne imunofluorescencije (IFAT). Tom metodom Pt se mogu otkriti između 7-28 dana nakon infekcije. Rezultati pretrage mogu biti lažno negativni u pasa s akutnom erlihiozom ako nije prošlo dovoljno vremena da se stvore Pt za *E. canis*. Ponovno testiranje preporuča se za 2-3 tjedna da se dokaže serokonverzija, a rezultati pretrage trebali bi se interpretirati zajedno s kliničkim simptomima i rezultatima testiranja na ostale potencijalne uzročnike psećih bolesti (SYKES, 2013). IgG titar Pt 1:80 ili > smatra se dokazom infekcije ili izloženosti uzročniku.

Psi s kroničnom infekcijom često imaju ekstremno veliki IFA titar, nekad veći od 1:600 000. Protutijela u krvi mogu perzistirati unatoč liječenju, ukazujući na prisutnost uzročnika u organizmu (SYKES, 2013).

Protutijela za *E. canis* mogu se dokazati i pomoću ELISA testa te metode Western blot, koja se obično koristi u istraživačke svrhe. Odgovor na terapiju također može poslužiti kao dijagnostička metoda.

Postoji jaka serološka unakrižna reakcija između *E. canis*, *E. chaffeensis* i *E. ewingii*, što može predstavljati problem u interpretaciji rezultata indirektne imunofluorescencije (GREENE, 2006). U nekim područjima, otprilike 50% pasa inficiranih *E. canis* također imaju Pt za *A. platys*, što ukazuje na česte koinfekcije, međutim, unakrižne reakcije između ta dva uzročnika bolesti nisu dokazane (MERCK, 2010).

Najspecifičnija metoda za otkrivanje uzročnika iz bioloških uzoraka molekularna je metoda pretrage PCR. Ova metoda najkorisnija je za dokaz infekcije u prvom tjednu bolesti, kada su serološki testovi često negativni. Kao uzorci za PCR uzimaju se puna krv, aspirat limfnih čvorova, aspirat slezene ili koštane srži.

Diferencijalnodijagnostički treba isključiti ostale bolesti koje uzrokuju vrućicu i limfadenopatije, brucelozu, blastomikozu, imunoposredovane bolesti i limfosarkom (MERCK, 2010).

2.5.1.5. Liječenje

U liječenju erlihioze koju uzrokuje *E. canis* najčešće se rabe tetraciklini. Lijek izbora je doksiciklin zbog njegove superiorne penetracije u stanice i bakteriostatskog učinka prema erlihijama. Doksiciklin se koristi u pasa svih dobi. Ukoliko se sumnja na infekciju erlihijama treba odmah započeti s empirijskim liječenjem i ne treba čekati na rezultate laboratorijske analize. Preporučena doza za doksiciklin iznosi 5-10 mg/kg/dan, PO ili IV, a liječenje bi trebalo trajati četiri tjedna. Tetraciklin se koristi u dozi od 22 mg/kg, PO, tid, više od dva tjedna za liječenje akutne infekcije, dok se kod kronične infekcije može koristiti 1-2 mjeseca. Istražena je i učinkovitost zamjenskih antimikrobnih preparata kao što su kloramfenikol, imidokarb dipropionat, enrofloksacin, rifampicin i levofloksacin no njihova učinkovitost nije u potpunosti dokazana. Oboljele životinje dobro reagiraju na primjenu specifične antimikrobne terapije pa do kliničkog poboljšanja dođe već za nekoliko dana. Kod kroničnih slučajeva odstupanja u krvnoj slici mogu perzistirati do 6 mjeseci, iako do povlačenja simptoma dolazi puno prije.

Potporna terapija nužna je da se spriječi propadanje organa i specifična organska disfunkcija, npr. transfuzija pune krvi ili trombocita potrebna je u slučajevima jakih krvarenja. Antibiotici širokog spektra koriste se u slučaju jake leukopenije. Kod kroničnih infekcija uspješna se pokazala kombinacija eritropoetina zajedno s prednizonom. Ako se trombocitopenija ne može riješiti doksiciklinom preporuča se kratkotrajna (do tjedan dana) terapija imunosupresivnim dozama kortikosteroida, zajedno s antibiotskom terapijom (SYKES, 2013).

Praćenje odgovora na terapiju vrlo je važno jer neke vrste erlihija mogu uzrokovati perzistentne infekcije. Razina trombocita mora se ponovno izmjeriti 1-3 mjeseca nakon završetka liječenja.

Liječenje seroreaktivnih, ali klinički zdravih pasa s normalnom krvnom slikom se ne preporuča jer može dovesti do antibiotske rezistencije.

Unatoč oporavku, ne dolazi do razvoja trajne imunosti pa su reinfekcije nakon provedene terapije moguće.

2.5.1.6. Preventiva

Prevenција bolesti temelji se na redovitoj primjeni sredstva protiv krpelja i izbjegavanju područja s dokazanom prisutnošću vektora. Pse treba preventivno tretirati protiv krpelja prije početka sezone njihove aktivnosti (od kraja veljače do početka ožujka). Potrebno je upotrebljavati proizvode koji se dobro podnose, dugo traju i sadržavaju učinkovite repelente protiv krpelja. Tretiranje pasa bi se trebalo ponavljati tijekom cijelog razdoblja opasnosti od krpelja, odnosno danas se smatra tijekom čitave godine (CVETNIĆ, 2013).

Ukoliko dođe do prihvata krpelja na psa, potrebno ga je što je prije moguće odstraniti na pravilan način.

Unutar endemskih područja, odnosno zbog velike učestalosti infekcija preporuča se pretraga serološkim testom svih pasa koji se uvode u uzgoj. Zbog opasnosti prijenosa svi psi potencijalni davatelji krvi morali bi biti pretraženi testom IFA, i to dva puta unutar 4 tjedna prije izbora, a nakon toga najmanjem jednom godišnje.

Trenutačno na tržištu ne postoje dokazano učinkovita cjepiva.

2.5.1.7. Javno zdravstvo

DNA *E. canis* dokazana je u nekih humanih pacijenata s kliničkim znakovima humane monocitne erlihioze, što ukazuje da je *E. canis* mogući uzročnik monocitne erlihioze u ljudi.

Odgovarajuće mjere opreza trebaju se primijeniti da se spriječi mogući prijenos uzročnika kod odstranjivanja krpelja te kod rukovanja s krvi i tkivom inficiranih pasa (SYKES, 2013).

2.5.2. *Ehrlichia ewingii*

2.5.2.1. Epizootiologija

Ehrlichia ewingii je uzročnik granulocitne erlihioze ljudi i pasa. Bolest je opisana u SAD, osobito u južnim i jugoistočnim dijelovima, u Africi i u Brazilu (SYKES, 2013).

Iako je DNA *E. ewingii* dokazana i u krpeljima vrste *Dermacentor variabilis* i *R. sanguineus*, jedini dokazani vektor je krpelj vrste *Amblyomma americanum* (Slika 18).

Bjelorepi jelen smatra se glavnim rezervoarom uzročnika (SYKES, 2013).



Slika 18. Odrasli stadiji krpelja *Amblyomma americanum*.

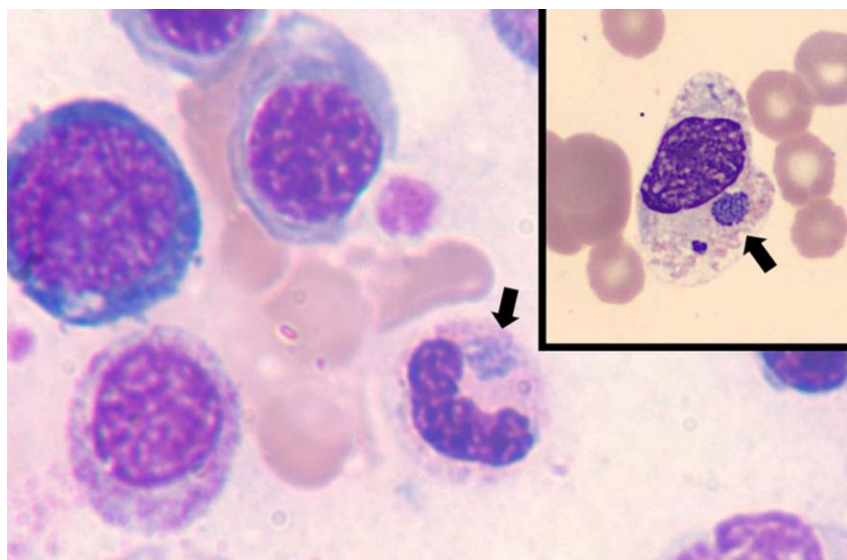
(Izvor: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/medical/lone_star_tick.htm)

2.5.2.2. Patogeneza

E. ewingii obitava unutar fagosoma u neutrofilima kralježnjaka nakon što uđe u njih procesom endocitoze. U fagosomu pomoću nepoznatih mehanizama izbjegava fagolizosomalnu funkciju. Nakon invazije, erlihija se umnožava u stanicama 2-3 dana dvojnomo diobom. Replikacija u vakuolama neutrofila rezultira tvorbom morula koje su vidljive svjetlosnim mikroskopom (Slika 19). Poput *A. phagocytophilum* odgađa apoptozu neutrofila omogućujući dulji životni vijek stanica. Nakon rupture inficiranih stanica uzročnici bolesti bivaju otpušteni u cirkulaciju te nficiraju nove stanice (GREENE, 2006).

Za razliku od infekcije *E. canis*, pretpostavlja se da infekcija *E. ewingii* uzrokuje samo akutni oblik bolesti, dok kronični oblik nije opisan.

Kod sisavaca, erlihije imaju tropizam prema tkivu mononuklearno-fagocitnog sustava (koštana srž, jetra, slezena i limfni čvorovi).



Slika 19. Morula unutar granulocita.

(Izvor: <http://jcm.asm.org/content/52/11/4102.figures-only>)

2.5.2.3. Klinička slika

Nakon eksperimentalne infekcije simptomi bolesti javljaju se nakon inkubacijskog perioda od 3-4 tjedna.

Bolest uzrokovana bakterijom *E. ewingii* prvotno je opisana kao akutni poliartritis sindrom. Iako je poliartritis karakterističan za infekciju, psi obično pokazuju druge nespecifične znakove poput povišene tjelesne temperature, depresije, letargije, anoreksije. Povraćanje i proljev rijetko se javljaju. Neurološki znakovi opisani su u prirodno inficiranih pasa, a uključuju ataksiju, pareze, propioceptivne deficite, anizokoriju, tremor ili vestibularnu disfunkciju. Klinička slika bolesti općenito je puno blaža od infekcije s *E. canis*. Uzročnik se može naći i u klinički zdravih pasa pa se psi smatraju potencijalnim rezervoarima (SYKES, 2013).

2.5.2.4. Dijagnostika

E. ewingii uzrokuje sezonsku i regionalnu bolest koja ovisi o aktivnosti vektora i području u kojem on obitava. Krpelji vrste *A. americanum* aktivni su od proljeća do kasne jeseni, ali su mogući slučajevi infekcije u zimskim mjesecima. Najčešći laboratorijski nalaz čine neregenerativna anemija i trombocitopenija te blagi porast serumske ALP ili ALT.

Anamneza, klinički simptomi, hematološki nalaz i prisutnost morule u granulocitima u krvi ili sinovijalnoj tekućini i serološki testovi pomažu u postavljanju sumnje na infekciju, dok se konačna dijagnoza potvrđuje molekularnom metodom PCR.

2.5.2.5. Liječenje

Kod infekcije *E. ewingii*, terapija doksiciklinom postiže brze rezultate (za 24-48 sati). Preporuča se liječenje u trajanju od 2-4 tjedna da bi se uspješno eliminirala infekcija.

Supklinički inficirani psi s pozitivnim PCR testom mogu spontano eliminirati uzročnike i liječenje u takvih pasa nije potrebno (SYKES, 2013).

2.5.2.6. Preventiva

Profilaksa uključuje izbjegavanje područja s krpeljima i korištenje sredstava za zaštitu od istih. Bitno je što prije skinuti krpelja sa psa. Potencijalni davatelji krvi moraju se testirati na infekciju *E. ewingii* pomoću *E. ewingii* specifične ELISA-e i PCR metode.

2.5.2.7. Javno zdravstvo

Godine 1999. otkriveno je da vrsta *E. ewingii*, koja uzrokuje granulomatoznu erlihiozu pasa, može uzrokovati humanu granulomatoznu erlihiozu (HGE) čovjeka.

Bolesti su osobito podložne imunodeficijentne osobe. Do sada je opisana samo u SAD-u (CVETNIĆ, 2013). Infekcija u ljudi očituje se glavoboljom, vrućicom i trombocitopenijom, sa ili bez leukopenije. Liječi se doksiciklinom. Učinkovita preventivna mjera jest izbjegavanje područja na kojima ima krpelja.

2.5.3. *Ehrlichia chaffeensis*

2.5.3.1. Epizootiologija

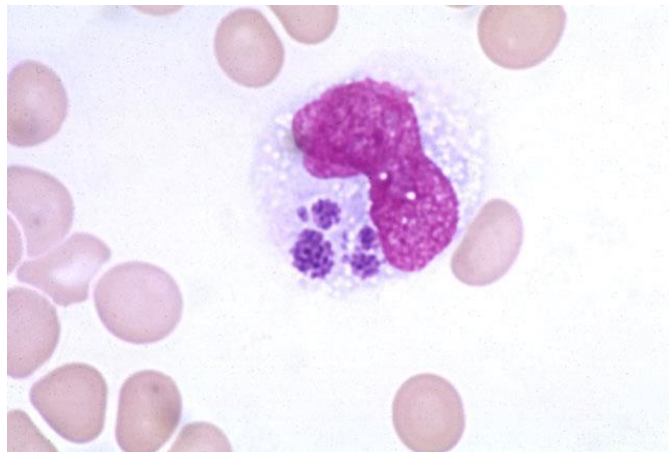
Ehrlichia chaffeensis uzročnik je emergentne bolesti u ljudi, humane monocitne erlihioze (HME). Osim ljudi inficirati se mogu i psi, koze, kojoti, mačke i jeleni. Bjelorepi jelen glavni je rezervoar uzročnika bolesti, dok se ljudi, psi i ostali kralješnjaci smatraju slučajnim domaćinima (NAIR i sur., 2014). Ipak, zbog perzistentne infekcije i psi se smatraju potencijalnim rezervoarima uzročnika (GREENE, 2006).

Vektori *E. chaffeensis* su krpelji vrste *Dermacentor variabilis*.

Infekcija *E. chaffeensis* opisana je u Americi, Africi, Aziji i Europi, a učestalost bolesti ovisiti će o aktivnosti i geografskoj rasprostranjenosti vektora. Dokazano je da do infekcije može doći i putem transfuzije krvi zaraženog pacijenta i transplatacije organa (MERCK, 2010).

2.5.3.2. Patogeneza

Erlihije se iz inficiranog vektora prenose u krvne stanice čovjeka ili životinje. *E. chaffeensis* primarno inficira monocite u koje ulazi procesom endocitoze te u njima tvori nakupine bakterija nazvane morule (Slika 20).



Slika 20. *Ehrlichia chaffeensis*, morule unutar leukocita.

(Izvor: <http://www.asm.org/division/c/photo/echaff1.jpg>)

2.5.3.3. Klinička slika

Klinički simptomi slični su onima kod infekcije s *E. canis*, no puno blaži te infekcija često prolazi bez liječenja. Tijekom inkubacijskog perioda od 8-20 dana organizmi se umnažaju u monocitima binarnom diobom i šire se po cijelom organizmu domaćina. Najčešći simptom je povišena tjelesna temperatura. Trombocitopenija i blaga leukopenija ili leukocitoza pojavljuju se u akutnoj fazi infekcije. Opisano je nekoliko težih slučajeva bolesti s poremećajima krvarenja (petehije, ekhimoze, hematurija, epistaksa), povraćanjem i limfadenopatijom, obično u koinfekciji s nekim drugim patogenim mikroorganizmima, primjerice s *Babesia spp.* U koinfekciji *E. chaffeensis* i *Leptospira spp.* (sv. Grippotyphosa) opisana je pojava uveitisa i zatajenja bubrega.

Klinički zdravi psi u endemičnim područjima često imaju visoki titar Pt za *E. chaffeensis*, što sugerira da psi mogu biti kronično inficirani ili klinički inaperentni nosioci uzročnika i prema tome mogući rezervoari bolesti (GREENE, 2006).

2.5.3.4. Dijagnostika

Dijagnoza bolesti temelji se na kliničkim znakovima, epidemiološkim podacima, laboratorijskim abnormalnostima i rezultatima seroloških i molekularnih testova. Identifikacija morula u cirkulirajućim monocitima u krvnom razmazu moguća je u početku infekcije, no često ih je teško razlikovati od morula *E. canis*. Uzgoj na umjetnim podlogama (DH82 pseće histiocitne stanice) rabi se uglavnom u istraživačke svrhe i smatra se nepraktičnim za rutinsku dijagnostiku erlihioze.

2.5.3.5. Liječenje

Lijek izbora je doksiciklin u dozi od 10 mg/kg PO q24h u trajanju od 28 dana (NEER i sur., 2002).

2.5.3.6. Preventiva

Prevenција infekcije u endemskim područjima temelji se na kontroli vektora te izbjegavanju područja na kojima ima krpelja. Cjepivo ne postoji.

2.5.3.7. Javno zdravstvo

Humana monocitna erlihioza je zoonoza izazvana vrstom *E. chaffeensis*. Klinički znakovi bolesti podsjećaju na influencu: glavobolja, povišena tjelesna temperatura, malaksalost (GREENE, 2006). U kasnijem tijeku bolesti izraženi su mučnina, anoreksija i gubitak tjelesne težine. Stopa smrtnosti za HME iznosi 2-5% (CVETNIĆ, 2013). Teža klinička slika sa mogućim smrtnim ishodom obično se javlja u imunokompromitiranih osoba. Rizik od infekcije povećan je tijekom skidanja krpelja, osobito ako se radi golim rukama, kada je moguć doticaj sa ekskretom i tjelesnim izlučevinama krpelja.

Najbolji način osobne zaštite protiv napada krpelja uključuje izbjegavanje ili što manje provedeno vrijeme u staništima u kojima se nalaze krpelji za vrijeme njihovog sezonskog vrhunca, korištenje zaštitne odjeće i različitih repelenata, pregled cijelog tijela nakon boravka u prirodi te brzo skidanje pričvršćenih krpelja radi smanjenja mogućnosti prijenosa patogena. Brojnost krpelja u okolišu može se znatno smanjit tretiranjem insekticidom ili akaricidom, u kombinaciji s uređivanjem okoliša (TENI, 2012).

3. ZAKLJUČCI

Posljednjih godina uočena je povećana pojavnost krpeljno prenosivih bolesti u pasa čiji su uzročnici bakterije iz rodova *Ehrlichia* i *Anaplasma*. Razlog tome su klimatske i okolišne promjene koje su rezultirale širenjem staništa krpelja i njihovih patogena, migracije i transport divljači te povećana aktivnost ljudi u krpeljnim staništima. Zbog povećane svijesti o krpeljno prenosivim bolestima, češće je prepoznavanje samih bolesti i lakše dijagnosticiranje te prijava istih, čemu uvelike pridonosi uporaba napredne tehnologije dijagnostike.

Na europskom području u pasa su dokazane infekcije vrstama *E. canis*, *A. phagocytophilum* i *A. platys*.

E. canis u pasa uzrokuje bolest koju nazivamo pseća monocitna erlihioza. Glavni, i vjerojatno jedini vektor za *E. canis* u Europi je krpelj *Rhipicephalus sanguineus*, poznatiji kao smeđi pseći krpelj. Najčešće se javlja u mediteranskom području, no kada se zbog kretanja domaćina nađe u hladnijem području, može preživjeti u zatvorenim prostorima uzgajivačnica i drugim nastambama (kuće, pseće kućice i nastambe divljih životinja). Sukladno tome, sve mediteranske države endemska su područja za *E. canis*, a nedavna istraživanja ukazuju na širenje uzročnika bolesti na sjevernija područja.

A. phagocytophilum upasa uzrokuje bolest koju nazovamo granulocitna anaplazmoza. *Ixodes ricinus* jedini je poznati vektor za *A. phagocytophilum* u Europi. Ova vrsta krpelja proširena je po skoro cijeloj Europi, uključujući zapadnu Norvešku i Švedsku. Najčešće obitava u mješovitim šumama, otvorenim pašnjacima i ostalim područjima sa velikom vlagom. Ovisno o odabranim dijagnostičkim metodama i uzorku (klinički bolesni psi, psi iz skloništa za životinje, zdrava populacija pasa) različite europske države prijavljuju širok raspon incidencije od 3-57 % ove bolesti.

A. platys uzrokuje cikličku trombocitopeniju u pasa. Obzirom da infekcija najčešće prolazi klinički inaparentno, informacije o učestalosti ove bolesti u Europi su ograničene. Molekularnim istraživanjima otkrivena je DNK *A. platys* u krpeljima vrste *R. sanguineus*, što ukazuje na to da ti krpelji djeluju kao vektori za *A. platys*.

Infekcija anaplazmama i erlihijama može proći klinički inaparentno. Ako dođe do kliničkog očitivanja bolesti, simptomi koji se javljaju su prilično varijabilni i nespecifični. Klinička očitovanja granulocitne anaplazmoze i akutne monocitne erlihioze mogu biti vrlo slični s razlikom što je anaplazmoza u pasa obično puno blaža bolest.

Kod pseće monocitne erlihioze možemo razlikovati tri stadija: akutni, supklinički i kronični. Akutni oblik bolesti karakteriziran je povišenom tjelesnom temperaturom, apatijom, slabošću i pridruženim respiratornim simptomima, hromošću i povećanom sklonošću krvarenjima. Laboratorijski nalaz uključuje trombocitopeniju, anemiju i leukopeniju. Supklinički oblik traje nekoliko mjeseci do jedne godine te u jednog dijela životinje prelazi u kronični oblik bolesti. Tipični nalaz kronične monocitne erlihioze je pancitopenija. Bolest se klinički očituje blažim, nespecifičnim simptomima koji mogu potrajati i do 5 godina ili pak teškom kliničkom slikom praćenom jakom leukopenijom, teškom anemijom i trombocitopenijom uz negativnu prognozu.

Najčešći klinički znakovi koji se javljaju kod granulocitne anaplazmoze također su nespecifični; uključuju letargiju, inapetencu/anoreksiju i groznicu. Ostatak nalaza čine blijede sluznice, napeti abdomen i gastrointestinalni znakovi (povraćanje, proljev). Hromost se relativno često javlja, a posljedica je sekundarnog imunoposredovanog poliartritisa. U nekim slučajevima javljaju se blago povećani limfni čvorovi, ubrzano disanje i površinska krvarenja (petehije, melena, epistaksa). U rijetkim slučajevima dolazi do kolapsa, kašlja, proširenja krvnih žila bjeloočnice, uveitisa, edema udova i polidipsije/poliurije.

A. platys uzrokuje nespecifične znakove kao što su groznica, letargija, anoreksija, gubitak tjelesne mase, blijede sluznice, iscjedak iz nosa i limfadenomegaliju. U nekim slučajevima bolesti opisan je uveitis i epistaksa.

Infekcije ostalim erlihijama u pasa karakteristične su po blažoj kliničkoj slici od one koja se javlja kod pseće monocitne erlihioze. Infekcije bakterijom *E. ewingii* očituju se pojavom nespecifičnih kliničkih znakova te poliartritis sindromom uz povremeni razvoj neuroloških znakova. Uzročnik se često može naći u klinički zdravih pasa te se psi posljedično tome smatraju potencijalnim rezervoarima infekcije.

Kod infekcije bakterijom *E. chaffeensis* javlja se povišena tjelesna temperatura kao najčešći klinički simptom. U koinfekciji s ostalim patogenima dolazi do teže kliničke slike s poremećajima krvarenja, povraćanjem, limfadenopatijom, uveitisom i zatajenjem bubrega. Klinički zdravi psi u endemičnim područjima često imaju visoki titar Pt za *E. chaffeensis* što ih čini mogućim rezervoarima bolesti.

Obje erlihije mogu uzrokovati bolest kod ljudi, *E. ewingii* uzročnik je humane granulomatozne erlihioze, a *E. chaffeensis* humane monocitne erlihioze. Bolesti se učinkovito liječe tetraciklinima.

Najčešći laboratorijski nalaz kod pseće erlihioze i anaplazmoze je trombocitopenija; taj nalaz uz anamnestičke podatke o kretanju životinje unutar endemskog područja ili o nalasku krpelja najčešće pobuđuje sumnju kod veterinaru kliničara. Objektivna dijagnostika provodi se direktnom vizualizacijom uzročnika (morule), serološkim testiranjem parnih seruma odnosno molekularnim metodama PCR-a koje su i najosjetljivije. .

Relativno su česte koinfekcije ostalim patogenima koje prenose iste ili različite vrste krpelja, što dodatno utječe na kliničku manifestaciju odnosno otežava dijagnostiku.

Za sve erlihioze i anaplazmoze u pasa lijek izbora je doksiciklin u dozi od 5-10 mg/kg u trajanju od 2-4 tjedna, ovisno o kojem se uzročniku radi. Liječenje granulocitne anaplazmoze traje 2-3 tjedna, cikličke trombocitopenije 8-10 dana, a pseće monocitne erlihioze 10-21 dan.

4. LITERATURA

BEAUFILS, J. P., H. INOKUMA, J. MARTIN-GRANEL i sur. (2002): *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France : description of the case, and characterization of the agent. *Revue Méd. Vét.* 153, 2, 85-90.

BEDRICA, LJ., A. MARINCULIĆ (2006): Krpelji šikare i bolesti uzrokovane nekim krvnim patogenim organizmima pasa i mačaka. *HVV*. Vol. 29. 99-111.

BREITSCHWERDT, EB. (2007): Canine and feline ehrlichiosis and anaplasmosis.

<http://www.delawarevalleyacademyvm.org/pdfs/jun07/Anaplasmosis.pdf>

CVETNIĆ, Ž. (2013): Bakterijske i gljivične zoonoze, Medicinska naklada Zagreb, Hrvatski veterinarski institut. Str. 92-99.

CARRADE, D. D., J. E. FOLEY, D. L. BORJESSON, J. E. SYKES (2009): Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *J. Vet. Intern. Med.* Vol. 23. 1129-1141.

DE LA FUENTE, J., A. LEW, H. LUTZ i sur. (2005): Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Animal Health Research reviews* 6(1); 75-89.

DUMLER, J. S., A. F. BARBET, C. P. J. BEKKER i sur. (2001): Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 2145-2165.

DYACHENKO, V., N. PANTCHEV, H-J. BALZER i sur. (2012): First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. Parasites & Vectors. 5:49.

FERNANDES FERREIRA, R., A. De MIELLO FIGUEIRENDO CERQUIRA, A. MÜLLER PEREIRA i sur. (2007): *Anaplasma platys* Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests. Intern J. Appl. Res. Vet. Med. Vol. 5. 113-119.

GREENE, C. E. (2006): Infectious diseases of dog and cat, 3rd ed, Elsevier, Philadelphia, USA. Str. 203-231.

HARTELT, K., R. OEHME, H. FRANK, S. O. BROCKMANN i sur. (2004): Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. Int. J. Med. Microbiol. 293, 86-92.

HEGARTY, B.C., B.A. QUROLLO, B. THOMAS, K. PARK i sur. (2015): Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. Parasites & Vectors. 8:320.

MERCK (2010): Veterinary manual, 10th ed, Merck & CO., INC, Whitehouse station, N.J., USA. Str. 19-21.

MULIĆ, R., B. PETKOVIĆ, Z. KLIŠMANIĆ, I. JERONČIĆ (2011): Bolesti koje se prenose krpeljima na području Hrvatske. Liječ. Vjesn. 133: 89-95.

NAIR, A.D.S., C. CHENG, D. C. JAWORSKI i sur. (2014): *Ehrlichia chaffeensis* Infection in the Reservoir Host (White-tailed deer) and in an Incidental Host (Dog) Is Impacted by Its Prior Growth in Macrophage and Tick Cell Environments. PloS ONE 9(10): e 109056.

NEER, T. M., E. B. BREITSCHWERDT, R. T. GREENE, M. R. LAPPIN (2002): Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. J. Vet. Intern. Med. 16:309-315.

PANTCHEV, N., S. PLUTA, E. HUISINGA, S. NATHER i sur. (2015): Tick-borne diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis. Parasitol. Res. 114. 19-54.

PROCAJLO, A., E. M. SKUPIEŃ, M. BLADOWSKI, S. LEW (2011): Monocytic Ehrlichiosis in dogs. Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 14, 515-520.

RENÉ-MARTELLET, M., I. LEBERT, J. CHÊNE i sur. (2015): Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. Parasites & Vectors. 8:3.

RIKIHISA, Y. (2010): *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. Nature Vol. 8, 328-339.

RIKIHISA, Y. (2011): Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin. Microbiol. Rev.; 24:469-489.

RUNGSIPAT, A., M. ODA, N. KUMPOOSIRI, S. WANGNAITHAM i sur. (2008): Clinicopathological study of experimentally induced canine monocytic ehrlichiosis. Comp. Clin. Pathol. 18:13-22.

SAINZ, Á., X. ROURA, G. MIRÓ, A. ESTRADA-PEÑA, B. KOHN, S. HARRUS, L. SOLANO-GALLEGO (2015): Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasites & Vectors. 8:75.

SAVIĆ, S., B. VIDIĆ, Z. GRGIĆ, A. POTKONJAK, LJ. SPASOJEVIC (2014): Emerging vector-borne diseases – incidence through vectors. Frontiers in public health. Vol. 2. Article 267.

SYKES, J.E. (2013): Canine and feline infectious diseases, 1st ed, Elsevier, Philadelphia, USA. Str. 279-298.

TENI, M. (2012): Faunistička, ekološka istraživanja krpelja (ACARI: IXODIDAE) na području Mikleuša. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju.

THEILER, A. (1910): *Anaplasma marginale* (gen. and spec. Nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from specific disease. Transvaal S. Afr. Rep. Vet. Bacteriol. Dept. Agr. 1908-9: 7-64.

THEILER, A. (1911): Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. 1st
Rep. Dir. Vet. Res. August. 1911: 7-46.

5. SAŽETAK

Erlihioze i anaplazmoze u pasa važne su krpeljno prenosive bolesti uzrokovane različitim vrstama bakterija iz roda *Ehrlichia* i *Anaplasma*. Erlihije i anaplazme inficiraju različite krvne stanice, ovisno o njihovom tropizmu, a imena bolesti koje uzrokuju temelje na vrsti inficiranih stanica i vrsti domaćina. Tako *Anaplasma phagocytophilum* uzrokuje granulocitnu anaplazmozu (ljudi, pasa, konja, goveda, ovaca i koza), *A. platys* pseću cikličku trombocitopeniju, a *Ehrlichia canis* pseću monocitnu erlihiozu. Ove bolesti imaju široku geografsku rasprostranjenost, a novija europska istraživanja ukazuju na njihovu sve veću pojavnost. Glavni rezervoari ovih bolesti u prirodi su razne divlje, ali i domaće životinjske vrste, no broj oboljelih životinja i ljudi uglavnom ovisi o prisustvu i gustoći vektora (krpelja) koji bolest prenose. Osim ova tri najznačajnija patogena, u pasa su dokazane i infekcije vrstama *E. ewingii* (granulocitna erlihioza) i *E. chaffeensis* (monocitna erlihioza). Ove infekcije se za sada uglavnom javljaju na prostorima Sjedinjenih Američkih Država, prijavljeni su i slučajevi u južnoj Americi, Africi i Aziji, no za sada nema podatka o njihovoj prisutnosti u Europi. Kliničko očitovanje bolesti uzrokovane erlihijama i anaplazmama vrlo je raznoliko. Moguće su subkliničke infekcije ili blagi slučajevi pa sve do teških infekcija s posljedičnim smrtnim ishodom. Obzirom na varijabilnost kliničke slike, nedostatak karakterističnih simptoma te činjenicu da u endemskim područjima u pasa često možemo naći rezidualan titar, dijagnostika ovih bolesti nije jednostavna već se često moramo služiti kombinacijom više dijagnostičkih metoda. Specifična antibiotska terapija uglavnom se svodi na uporabu doksiciklina, no duljina trajanja liječenja ovisi o vrsti uzročnika. Obzirom na nedostatak učinkovitog cjepiva mjere profilakse se temelje na uporabi različitih mjera zaštite od vektora koji bolest prenose.

Ključne riječi: erlihioza, anaplazmoza, infekcije, dijagnostika, terapija

6. SUMMARY

Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs

Canine ehrlichiosis and anaplasmosis are important tick-borne diseases caused by different species of bacteria from the genus *Ehrlichia* and *Anaplasma*. Different bacterial species target specific cell types. Names of diseases they are causing are formed depending on the type of infected cells and host species. Thus *Anaplasma phagocytophilum* causes granulocytic anaplasmosis (humans, dogs, horses, cattle, sheep and goats), *A. platys* canine cyclic thrombocytopenia and *Ehrlichia canis* canine monocytic ehrlichiosis. These diseases have wide geographical coverage, and recent European surveys point to their ever-increasing occurrence. The main reservoirs of these diseases in nature are different wild and domestic animal species, but the number of diseased animals and humans mostly depends on the presence and density of the vectors (e.g. ticks). In addition to these three most significant pathogens, infections with *E. ewingii* (granulocytic ehrlichiosis) and *E. chaffeensis* (monocytic ehrlichiosis) were also confirmed in dogs. These infections are mostly occurring in the United States, and cases have been reported in South America, Africa and Asia, but for now there is no evidence of their presence in Europe. Clinical manifestations of diseases caused by *Ehrlichia* and *Anaplasma* are very diverse. Subclinical infections or mild cases are common, but more serious clinical forms, even with lethal outcome can be noted. Given the clinical picture variability, the lack of characteristic symptoms and the fact that we often find a residual titer in endemic areas of dogs, the diagnosis of these diseases is not simple but we often have to use a combination of multiple diagnostic methods. Specific antibiotic therapy is mainly reduced to the use of doxycycline, but the duration of treatment depends on the type of the agent. Given the lack of effective vaccine, prophylaxis measures are based on the use of various vector protection measures that convey the disease.

Key words: ehrlichiosis, anaplasmosis, infections, diagnosis, therapy

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 03.08.1987. godine u Varaždinu. Pohađala sam osnovnu školu "Gustav Krklec" u Maruševcu, nakon koje upisujem Gimnaziju u Ivancu, opći smjer. Godine 2006. upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Kao studentica pohađam razne seminare i kongrese u veterinarskoj struci. Bavila sam se volontiranjem u sekciji "Gmazova i glodavaca" pod vodstvom prof. dr. sc. Alberta Marinculića te na klinici Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti. Tijekom cijelog studija radila sam razne studentske poslove. U slobodno vrijeme pomažem na obiteljskoj peradarskoj farmi te ocu u Veterinarskoj

a
m
b
u
l
a
n
t
i

M
a
r
u
š
e
v
c
u