



Η κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση του σκύλου στην Ευρώπη:

ένα αναδυόμενο κροτωνογενές λοιμώδες νόσημα



Αποστολίδης Κ.Ν.
Κτηνίατρος, Υποψήφιος
Διδάκτορας,
Παθολογική Κλινική,
Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σαριδομιελάκης Μ.Ν.
Κτηνίατρος, Διδάκτορας,
Διπλωματούχος Ευρωπαϊκό
Κολlegίου Κτηνιατρικής
Δερματολογίας, Αναπληρωτής
Καθηγητής Παθολογίας Ζώων
Συντροφιάς, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μυλωνάκης Μ.Ε.
Κτηνίατρος, Διδάκτορας,
Επίκουρος Καθηγητής
Παθολογίας Ζώων Συντροφιάς,
Κλινική των Ζώων Συντροφιάς,
Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή
Επιστημών Υγείας, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Υπεύθυνος αλληλογραφίας:
Κοσμάς Ν. Αποστολίδης,
Παθολογική Κλινική,
Τμήμα Κτηνιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τρικάλων 224, 43 100, Καρδίτσα,
Τηλ.: 2431 075038,
E-mail: kapostol@vet.uth.gr

Λέξεις- κλειδιά

- *Anaplasma phagocytophilum*,
- αναπλάσμωση,
- ζωοανθρωπονόσος,
- σκύλος

> Περίληψη

Το *Anaplasma phagocytophilum*, που είναι ενδοκυτταρικό, Gram-αρνητικό και αερόβιο βακτήριο, προκαλεί την κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση του ανθρώπου, του αλόγου, του σκύλου, της γάτας, του λύκου, των βοοειδών και των μικρών μηρυκαστικών. Το *A. phagocytophilum* έχει τροπισμό στα ουδετερόφιλα και σπανιότερα στα εωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα και στην Ευρώπη μεταδίδεται με τον κρότωνα *Ixodes ricinus*. Ένας σημαντικός αριθμός μικρών θηλαστικών και ελαφοειδών αποτελούν τη δεξαμενή του μικροοργανισμού στη φύση. Οι περισσότεροι μολυσμένοι σκύλοι παραμένουν ασυμπτωματικοί, ενώ η πλειονότητα εκείνων που νοσούν, παρουσιάζει μη ειδική συμπτωματολογία, όπως πυρετό, κατάπωση ή λήθαργο, ανορεξία και χλωτότητα. Το συχνότερο εργαστηριακό εύρημα της αναπλάσμωσης είναι η θρομβοκυτταροπενία. Η διάγνωση στηρίζεται στην ανεύρεση των συσσωματωμάτων του μικροοργανισμού (μορίδια) στο κυτταρόπλασμα των ουδετερόφιλων κυττάρων, την ορολογική ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων και την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Η θεραπεία εκλογής είναι η δοξυκυκλίνη, που χορηγείται στη δόση των 5 mg/kg Σ.Β./12ωρο, από το στόμα, για 2-4 εβδομάδες.

> Αιτιολογία

Η κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση (ΚΑ) του σκύλου οφείλεται στο βακτήριο *Anaplasma phagocytophilum* (τάξη: *Rickettsiales*, οικογένεια: *Anaplasmataceae*). Παλαιότερα, ο μικροοργανισμός αυτός αναφερόταν ως *Ehrlichia equi*, *A. phagocytophila* ή αιτιολογικός παράγοντας της κοκκιοκυτταρικής ερλιχίωσης του ανθρώπου, αλλά μετονομάστηκε σε *A. phagocytophilum* μετά την πρόσφατη τροποποίηση στην ταξινόμηση των ειδών των οικογενειών *Rickettsiaceae* και *Anaplasmataceae*, που στηρίχθηκε στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων 16S rRNA και groESL.¹⁻³ Το *A. phagocytophilum* περιλαμβάνει πολυάριθμα στελέχη που διαφέρουν ως προς τη γεωγραφική τους κατανομή, τα ζωικά είδη που προσβάλλουν και τη λοιμογόνο δράση τους. Για παράδειγμα, στελέχη που απομονώθηκαν στην Ευρώπη, δεν προκαλούν πειραματική νόσο στο άλογο και στελέχη που απομονώθηκαν από ανθρώπους στις Η.Π.Α. απέτυχαν να προκαλέσουν νόσο στα βοοειδή.⁴ Επιπλέον, η νοσηρότητα και η θνησιμότητα της ΚΑ του ανθρώπου στην Ευρώπη φαίνεται ότι είναι μικρότερη σε σύγκριση με τις Η.Π.Α.⁵

Το *A. phagocytophilum* είναι gram-αρνητικό, αερόβιο και υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό βακτήριο, με κοκκοειδή ή ελλειψοειδή μορφή, διάμετρο 0.2-2.0 μm και τροπισμό κυρίως στα ουδετερόφιλα και σπάνια στα εωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα. Οι μικροοργανισμοί εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων, μέσα σε κενοτόπια που σχηματίζονται από την κυτταρική μεμβράνη και στα οποία διαιρούνται με διχοτόμηση, παράγοντας 20 ή περισσότερα βακτήρια. Τα τελευταία συσσωματώνονται, δημιουργώντας έτσι το τυπικό μορίδιο (morula) που έχει διάμετρο 1.5-2.5 μm.⁶

> Επιζωοτιολογία

Μόλυνση από *A. phagocytophilum* έχει διαπιστωθεί, μέχρι σήμερα, μόνο στο Βόρειο ημισφαίριο, όπου οι κρότωνα του γένους *Ixodes* (σύμπλεγμα του *I. persulcatus*) είναι οι κύριοι ενδιάμεσοι ξενιστές του.^{6,7} Στην Ευρώπη, ο βασικός υπεύθυνος κρότωνα είναι ο *I. ricinus*, χωρίς βέβαια να μπορεί να αποκλειστεί ο ρόλος και άλλων ειδών κροτώνων. Για παράδειγμα στη Σαρδηνία, με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) βρέθη-



κε σε ένα από τους 50 (2%) κρότωνα του είδους *Rhipicephalus sanguineus* που εξετάστηκαν.⁸ Το βακτήριο μεταδίδεται διασταδιακά στους κρότωνα^{3,9} και στις φυσικές του δεξαμενές περιλαμβάνονται πολυάριθμα είδη, κυρίως όμως τα άγρια τρωκτικά και μηρυκαστικά (ελαφοειδή).¹

Το *A. phagocytophilum* έχει ανιχνευθεί με την PCR σε διάφορα είδη θηλαστικών σε όλες σχεδόν τις Ευρωπαϊκές χώρες. Εκτός από τα κατοικίδια μηρυκαστικά, έχει βρεθεί στο σκύλο, τη γάτα, το άλογο, τον όνο, τον ευρωπαϊκό βούβαλο, το κόκκινο ελάφι, την άλκη, το ζαρκάδι, τον αγριόχοιρο, το λύκο, τον Ευρασιατικό λύγκα, την κόκκινη αλεπού, το λαγό, τα μικρά τρωκτικά και τον άνθρωπο.^{10, 11} Όμως η νόσος (KA) έχει τεκμηριωθεί μόνο σε σκύλους, γάτες, άλογα, αγελάδες, πρόβατα, αίγες, ανθρώπους⁶ και πρόσφατα σε λύκους.^{6,10} Επισημαίνεται ότι επειδή ο σκύλος και ο άνθρωπος είναι τυχαίοι ξενιστές και εμφανίζουν μικρής διάρκειας βακτηριαμία (<28 ημέρες), ο ρόλος τους ως δεξαμενών του βακτηρίου δε φαίνεται να είναι σημαντικός.¹² Αντίθετα, τα αποδημητικά πτηνά ενδέχεται να έχουν μεγάλη επιζωοτιολογική σημασία μέσω της διασποράς των μολυσμένων κροτώνων σε μακρινές αποστάσεις.^{6,13-15}

Σε σπάνιες περιπτώσεις, η μετάδοση του *A. phagocytophilum* μπορεί να επιτευχθεί χωρίς τη μεσολάβηση κροτώνων.⁷ Αυτό μπορεί να συμβεί με τον πειραματικό ενοφθαλμισμό ή τη μετάγγιση αίματος. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ενδονοσοκομειακή καθώς και μόλυνση ανθρώπων από σφάγια ελαφιών κατά τη διάρκεια της εκδοράς.^{7,16} Η μετάδοση μέσω του πλακούντα έχει αποδειχθεί στις αγελάδες, στις οποίες το *A. phagocytophilum* έχει βρεθεί επιπλέον και στα λευκά αιμοσφαίρια του γάλακτος, ύστερα από πειραματική μόλυνση.^{17,18} Όμως, σε πρόσφατο περιστατικό κυοφορούσας σκύλας με KA, δε διαπιστώθηκε περιγεννητική μετάδοση του βακτηρίου σε κανένα από τα πέντε κουτάβια της τοκετομάδας.¹⁹

Η συχνότητα μόλυνσης του σκύλου από το *A. phagocytophilum* έχει μελετηθεί εκτενώς με βάση τις ορολογικές εξετάσεις, ενώ αντίθετα είναι ελάχιστες οι επιζωοτιολογικές μελέτες που στηρίζονται στις μοριακές. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μελετών είναι δύσκολη, λόγω των σημαντικών διαφορών στο σχεδιασμό τους (π.χ. εξέταση δειγμάτων από υγιείς ή άρρωστους σκύλους, από σκύλους που προσκομίσθηκαν σε κτηνιατρεία πρωτοβάθμιας περίθαλψης ή σε κλινικές δεύτερης γνώμης, εποχή δειγματοληψίας).⁶ Επιπλέον, η οροθετικότητα δεν αντανακλά αποκλειστικά την έκθεση των σκύλων στο *A. phagocytophilum*, καθώς μπορεί να υπάρχουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα είδη αναπλάσμιτων, όπως το *A. platys*.⁷ Παρά τους παραπάνω περιορισμούς, τα ποσοστά των οροθετικών σκύλων σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες κυμαίνονται από 5% μέχρι και 70.5%,⁶ γεγονός που κάνει

την KA του σκύλου ένα σημαντικό αναδυόμενο κροτωνογενές λοιμώδες νόσημα. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί κλινικά περιστατικά KA στη Αυστρία,²⁰ τη Γαλλία,²¹ τη Γερμανία,²² την Ελβετία,²³ το Ηνωμένο Βασίλειο,²⁴ την Ισπανία,²⁵ την Ιταλία,^{26,27} την Πολωνία,²⁸ την Πορτογαλία,²⁹ τη Σλοβακία,³⁰ τη Σλοβενία^{31,32} και τη Σουηδία.^{33,34} Στη χώρα μας, η KA έχει διαγνωστεί σε ορισμένους σκύλους, με βάση κυτταρολογικές, ορολογικές και μοριακές εξετάσεις,^{35,36} ενώ πρόσφατα διαπιστώθηκε αιμορραγική διάθεση σε κριάρι που αποδόθηκε σε μόλυνση από *A. phagocytophilum* με βάση το αποτέλεσμα της ορολογικής εξέτασης.³⁷ Τέλος, το DNA του *A. phagocytophilum* έχει ανιχνευτεί σε κρότωνα *I. ricinus*.³⁸

Η μόλυνση του σκύλου από το *A. Phagocytophilum* και η εκδήλωση των συμπτωμάτων της KA εξαρτώνται από την εποχή του έτους, την ηλικία, τη φυλή και τις συνυπάρχουσες μολύνσεις.⁷ Στις Η.Π.Α. η KA διαπιστώνεται συχνότερα από την άνοιξη μέχρι τις αρχές του καλοκαιριού καθώς και το φθινόπωρο,⁶ ενώ στη Γερμανία η διάγνωσή της στους 17 από τους 18 σκύλους έγινε μεταξύ Απριλίου και Σεπτεμβρίου.³⁹ Το ποσοστό των οροθετικών σκύλων αυξάνει με την ηλικία⁴⁰ και η μέση ηλικία των σκύλων με KA κυμαίνεται μεταξύ 6 και 8 ετών.^{34,39,41,42} Περίπου οι μισοί μολυσμένοι σκύλοι σε μία μελέτη ανήκαν στη φυλή Golden retriever, ενώ σε άλλες έρευνες δε διαπιστώθηκε προδιάθεση ως προς τη φυλή.³⁴ Οι συνυπάρχουσες αρθροποδογενείς μολύνσεις μπορούν να επηρεάσουν την κλινική και εργαστηριακή εικόνα του νοσήματος.⁷ Οι σύμμικτες μολύνσεις από *A. phagocytophilum* και *Borrelia burgdorferi sensu lato* είναι συχνές τόσο στη Βόρεια Αμερική⁶ όσο και την Ευρώπη⁴³⁻⁴⁶, αφού και οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί μεταδίδονται με τον ίδιο κρότωνα. Σχετικά συχνές είναι επίσης οι σύμμικτες μολύνσεις με μικροοργανισμούς των γενών *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Rickettsia* και *Babesia*.⁷





> Παθογένεια

Οι κρότωναες του γένους *Ixodes* χρειάζονται από 24 έως και 48 ώρες από την προσκόλλησή τους μέχρι να ενοφθαλμίσουν το *A. phagocytophilum* στον ξενιστή. Το βακτήριο διαθέτει σύνθετους μηχανισμούς αποφυγής της άμυνας των ουδετερόφιλων. Συγκεκριμένα, αφού προσκολληθεί στα κύτταρα αυτά μέσω της Ρ-σελεκτίνης (CD62-P) και εισέλθει στο κυτταρόπλασμα με ενδοκυττάρωση, τροποποιεί, με στόχο την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του, ορισμένες βασικές λειτουργίες του ουδετερόφιλου. Έτσι, αναστέλλει τη φαγολυσσώματική οδό και την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου στα φαγοσωμάτια, μειώνει τη φαγοκυτταρική ικανότητα και την προσκόλλησή των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο των αγγείων και καθυστερεί την απόπτωση των μολυσμένων ουδετερόφιλων.⁷

Η περίοδος επώασης της νόσου κυμαίνεται από 1 ως 2 εβδομάδες και οι υπεύθυνοι παθογενετικοί μηχανισμοί δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Σε αυτούς ενδέχεται να περιλαμβάνονται η μυελοκαταστολή από τις κυτταροκίνες που παράγονται, οι διαταραχές της ωρίμανσης των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών, η ανοσολογική καταστροφή των αιμοσφαιρίων, η δυσλειτουργία των ουδετερόφιλων και η υπερκατανάλωση των αιμοπεταλίων.⁵

> Κλινική εικόνα και εργαστηριακά ευρήματα

Οι περισσότεροι μολυσμένοι σκύλοι παραμένουν κλινικά υγιείς,⁷ ενώ σε αντίθετη περίπτωση διαπιστώνονται συμπτώματα της οξείας νόσου. Αν και πολλοί σκύλοι παραμένουν υποκλινικοί φορείς του μικροοργανισμού για αρκετούς μήνες, χρόνια νόσος ανάλογη με εκείνη της μονοκυτταρικής ερλιχίωσης (*E. canis*) του σκύλου δεν έχει αποδειχθεί στην περίπτωση της ΚΑ. Επιπλέον, μέχρι σήμερα, δεν έχουν αναφερθεί θανατηφόρα περιστατικά ΚΑ στο σκύλο.⁵

Τα συχνότερα συμπτώματα της ΚΑ του σκύλου (Πίνακας 1) είναι ο πυρετός και η κατάπτωση ή ο λήθαργος που διαπιστώνονται στο 90% περίπου των περιστατικών,^{34,39,41,47,48} ενώ ιδιαίτερα συχνή είναι και η ανορεξία.^{41,42,48} Η περιφερική λεμφογαγγλιομεγαλία διαπιστώνεται στο 5-30% περίπου των περιστατικών, και η σπληνομεγαλία σε ποσοστό που κυμαίνεται από 10 μέχρι και 100%, ανάλογα με τη μελέτη.⁴⁹ Χωλότητα λόγω πολυαρθρίτιδας, απροθυμία μετακίνησης και μυοσκελετικό άλγος αναφέρονται σχετικά συχνά,^{41,50} ενώ στις σπανιότερες κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνονται οι έμετοι, η διάρροια, το κοιλιακό άλγος,⁵⁰⁻⁵² η πολυουρία, η πολυδιψία, η ταχύπνοια, η δύσπνοια, ο βήχας, η αιμορραγική διάθεση, η ραγοειδίτιδα και διάφορες νευρικές διαταραχές

Πίνακας 1. Συχνότητα των συμπτωμάτων, με βάση επιλεγμένες αναδρομικές μελέτες, σε σκύλους με κοκκιοκυτταρική αναπλάσωση

	Βιβλιογραφική πηγή (n=αριθμός σκύλων)			
	Granick, 2009 ⁴⁸	Kohn, 2008 ³⁹	Eberts, 2011 ⁴⁷	Egenvall, 1997 ²¹
	(n=34)	(n=18)	(n=18)	(n=14)
Πυρετός	27/32 (84%)	11/18 (61%)	16/18 (89%)	14/14(100%)
Κατάπτωση ή λήθαργος	25/34 (74%)	17/18 (94%)	13/18 (72%)	13/14 (93%)
Ανορεξία	21/34 (62%)	15/18 (83%)	ΔΑ	ΔΑ
Λεμφογαγγλιομεγαλία	11/34 (32%)	ΔΑ	1/18 (6%)	ΔΑ
Σπληνομεγαλία	4/34 (12%)	17/18 (94%)	ΔΑ	ΔΑ
Νευρολογικές διαταραχές	2/34 (6%)	ΔΑ	1/18 (6%)	ΔΑ
Αρθροπάθεια	2/34 (6%)	1/18 (6%)	10/18 (56%)	ΔΑ
Χωλότητα	11/34 (32%)	2/18 (11%)	10/18 (56%)	ΔΑ
Ταχύπνοια	10/34 (29%)	1/18 (6%)	ΔΑ	ΔΑ
Έμετος	8/34 (24%)	2/18 (11%)	1/18 (6%)	ΔΑ
Διάρροια	3/34 (9%)	3/18 (17%)	ΔΑ	ΔΑ
Κοιλιακός πόνος	3/34 (9%)	5/18 (28%)	ΔΑ	ΔΑ
Πετέχιες	ΔΑ	2/18 (11%)	ΔΑ	ΔΑ
Μέλαινα	ΔΑ	1/18 (6%)	ΔΑ	ΔΑ
Επίσταξη	ΔΑ	1/18 (6%)	1/18 (6%)	ΔΑ
Αιμορραγικό κολλικό έκκριμα	ΔΑ	ΔΑ	ΔΑ	1/14 (7%)

ΔΑ: δεν αναφέρεται



Πίνακας 2. Συχνότητα των εργαστηριακών διαταραχών, με βάση επιλεγμένες αναδρομικές μελέτες, σε σκύλους με κοκκιοκυτταρική αναπλάσμωση

	Βιβλιογραφική πηγή (n=αριθμός σκύλων)			
	Granick, 2009 ⁴⁸	Kohn, 2008 ³⁹	Eberts, 2011 ⁴⁷	Egenvall, 1997 ²¹
	(n=34)	(n=18)	(n=18)	(n=14)
Αναιμία	16/34 (47%)	11/18 (61%)	12/18 (67%)	2/6 (33%)
Λευκοκυττάρωση	6/34 (18%)	4/18 (22%)	ΔΑ	1/14 (7%)
Μονοκυττάρωση	ΔΑ	7/18 (39%)	1/18 (6%)	0/14 (0%)
Λευκοκυτταροπενία	3/34 (9%)	5/18 (28%)	10/18 (56%)	1/14 (7%)
Εωσινοπενία	ΔΑ	13/18(72%)	8/18 (44%)	11/14 (79%)
Λεμφοκυτταροπενία	20/31 (65%)	9/18 (50%)	7/18 (39%)	X/14
Θρομβοκυτταροπενία	21/22 (95%)	16/18 (89%)	17/18 (94%)	6/7 (86%)
Υπολευκωματιναιμία	12/27 (44%)	12/18 67%	ΔΑ	ΔΑ
↑ Αλκαλική φωσφατάση	14/27 (52%)	11/18(61%)	ΔΑ	1/7 (14%)
↑ Αλανινοαμινοτρανσφεράση	8/27 (30%)	2/18 (11%)	ΔΑ	0/10 (0%)
Υπερχολερυθριναιμία	10/27 (37%)	5/18 (28%)	ΔΑ	ΔΑ

ΔΑ: δεν αναφέρεται, (↑): αυξημένη δραστηριότητα, X: δεν αναφέρεται ο ακριβής αριθμός των σκύλων

(επιληπτικές κρίσεις, αταξία, αιθουσαίο σύνδρομο, συμπτώματα μηνιγγιτίδας).

Η θρομβοκυτταροπενία είναι η συχνότερη αιματολογική διαταραχή και διαπιστώνεται στο 90% περίπου των προσβεβλημένων σκύλων (Πίνακας 2). Η ήπια μη αναγεννητική αναιμία, η αύξηση ή μείωση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων, η λεμφοκυτταροπενία, η ουδετεροφιλία και η ουδετεροπενία διαπιστώνονται λιγότερο συχνά. Η υπολευκωματιναιμία, η υπερσφαιριναιμία και η ήπια αύξηση της δραστηριότητας των ηπατικών ενζύμων (αλκαλική φωσφατάση και αλανινοαμινοτρανσφεράση), αποτελούν τις κυριότερες βιοχημικές διαταραχές, ενώ, λιγότερο συχνή είναι η υπερχολερυθριναιμία.^{39,41,42,47,48}

> Διάγνωση

Εκτός από το ιστορικό (π.χ. πρόσφατη έκθεση σε κρότωνες) και τη συμβατή κλινική και εργαστηριακή εικόνα, η διάγνωση της ΚΑ επιβεβαιώνεται όταν πληρείται ένα τουλάχιστον από τα παρακάτω κριτήρια, που αποτελούν άλλωστε τη βάση του διαγνωστικού αλγόριθμου της ΚΑ στον άνθρωπο:⁷ (α) εντόπιση των μοριδίων μέσα στα ουδετερόφιλα σε συνδυασμό με τίτλο ειδικών αντισωμάτων με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού (IFA) $\geq 1/80$, (β) τετραπλασιασμός του τίτλου των αντισωμάτων σε ζεύγος ορών που λαμβάνονται σε μεσοδιάστημα 3-4 εβδομάδων, (γ) θετική PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς για το *A. phagocytophilum* εκκινητές, ή (δ) απομόνωση του

A. phagocytophilum από το αίμα ύστερα από καλλιέργεια σε ειδικές κυτταρικές σειρές.¹²

Η κυτταρολογική εξέταση των επιχρισμάτων από το περιφερικό αίμα ή τη στοιβάδα λευκών αιμοσφαιρίων-αιμοπεταλίων του αιματοκρίτη με χρώσεις τύπου Romanowsky (π.χ. Diff-Quik, Giemsa) έχει μεγάλη διαγνωστική ευαισθησία στα αρχικά στάδια της ΚΑ, αφού τα μορίδια (Εικόνα 1) βρίσκονται μέχρι και στο 32% των ουδετερόφιλων.³⁵ Τα μορίδια εμφανίζονται 4 ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση του σκύλου και παραμένουν σε μεγάλους αριθμούς για 4-8 ημέρες. Η διάκριση των μοριδίων του *A. phagocytophilum* από εκείνα της *Ehrlichia ewingii*, που επίσης εντοπίζονται στα ουδετερόφιλα, είναι αδύνατη στο οπτικό μικροσκόπιο και μπορεί να γίνει μόνο με την PCR.⁷

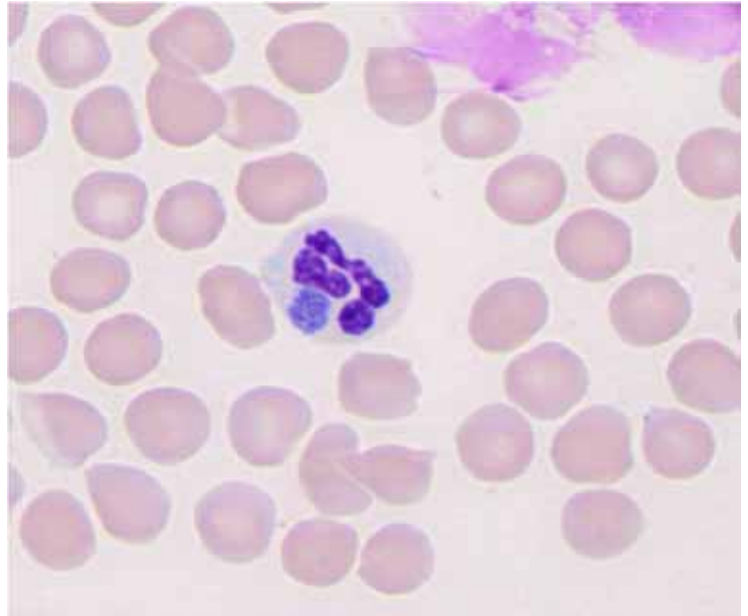
Στην κλινική πράξη, η διάγνωση της ΚΑ στηρίζεται συχνά στην ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων σε ζεύγος ορών που πάρθηκαν σε μεσοδιάστημα 3-4 εβδομάδων, αφού ο τετραπλασιασμός του τίτλου είναι ισχυρά ενδεικτικός της ενεργού μόλυνσης. Αντίθετα, οι μεμονωμένοι θετικοί τίτλοι αντισωμάτων δεν επιβεβαιώνουν την ενεργό μόλυνση, αφού μπορεί να οφείλονται σε παλαιότερη μόλυνση από το *A. phagocytophilum* και στη μακροχρόνια παραμονή τους (μέχρι και 12 μήνες) μετά την εκρίζωσή της (θεραπεία ή αυτοϊαση). Επιπλέον, επισημαίνεται ότι στην ΚΑ η εκδήλωση των συμπτωμάτων ενδέχεται να προηγηθεί της εμφάνισης ανιχνεύσιμου τίτλου αντισωμάτων.⁷ Για παράδειγμα, με τη δοκιμή IFA οι IgG ανοσοσφαιρίνες ανιχνεύονται 8 περίπου ημέρες μετά τη





> Ευχαριστίες

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον κτηνίατρο Andrew Graham Burton, (School of Veterinary Medicine, UC Davis, California, USA), για την ευγενική παραχώρηση της Εικόνας 1.



Εικόνα 1. Μορίδιο του *Anaplasma phagocytophilum* στο κυτταρόπλασμα ουδετερόφιλου σε επίχρισμα περιφερικού αίματος σκύλου (Φωτογραφικό αρχείο Andrew Graham Burton, DVM, School of Veterinary Medicine, UC Davis, California, USA)

μόλυνση και 2-5 ημέρες μετά την εμφάνιση των μοριδίων στα ουδετερόφιλα. Σήμερα είναι εμπορικά διαθέσιμη και μια πραγματοποιήσιμη στο χώρο του κτηνιατρείου (in-clinic) ανοσοενζυμική ορολογική δοκιμή (ELISA), η οποία χρησιμοποιεί την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Msp2/p44 για την ποιοτική εκτίμηση (θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα) της παρουσίας ή όχι αντισωμάτων έναντι του *A. phagocytophilum*.⁵³ Με τη δοκιμή αυτή, παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ του *A. phagocytophilum* και του *A. platys*, αλλά όχι με την *E. canis*.^{53,54}

Η συμβατική PCR και η PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR), σε συνδυασμό με αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων, έχουν μεγάλη διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του DNA του *A. phagocytophilum*, στο αίμα, το μυελό των οστών και το σπλήνα.⁷ Το αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει τη μόλυνση, αφού ο αριθμός των βακτηρίων στο δείγμα ενδέχεται να είναι μικρότερος από το όριο της διαγνωστικής ευαισθησίας της μεθόδου, γεγονός ιδιαίτερα πιθανό μετά τη χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής.¹⁶

Το *A. phagocytophilum* μπορεί να απομονωθεί από το αίμα με καλλιέργεια σε κυτταρικές σειρές προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας ανθρώπου (HL-60) ή σε εμβρυϊκές κυτταρικές σειρές κρότωνα. Η μέθοδος αυτή, αν και είναι πολύ μεγάλης διαγνωστικής ευαισθησίας, βρίσκει κυρίως ερευνητική και όχι κλινική εφαρμογή.⁷

> Θεραπεία και πρόγνωση

Η θεραπεία εκλογής για την ΚΑ του σκύλου θεωρείται η δοξυκυκλίνη, στη δόση των 5 mg/kg Σ.Β., από το στόμα, κάθε 12 ώρες, για 2-4 εβδομάδες.^{6,7} Οι περισσότεροι σκύλοι, παρουσιάζουν κλινική βελτίωση μέσα σε 24-48 ώρες από την έναρξη της αγωγής,⁷ χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα αν αυτή οδηγεί σε μικροβιολογική ίαση. Άλλα αντιμικροβιακά με τα οποία επιτυγχάνεται κλινική βελτίωση είναι οι φθοριοκινολόνες (π.χ. ενροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη)^{6,16} και η ριφαμικίνη που έχει χρησιμοποιηθεί και στην αντίστοιχη νόσο του ανθρώπου.¹⁶

Επειδή δεν υπάρχει εμβόλιο για το *A. phagocytophilum*, η πρόληψη βασίζεται στην αποφυγή έκθεσης των σκύλων στους κρότωνες, στη μηχανική απομάκρυνσή τους με ειδική λαβίδα, την τακτική χρήση εξωπαρασιτοκτόνων (π.χ. φιπρονίλη, αμιπράζη, πυρεθροειδή) και ενδεχομένως στην ολιγοήμερη προληπτική χρήση δοξυκυκλίνης όταν ο σκύλος ταξιδεύει σε ενδημικές περιοχές.^{6,16,22,55}

> Σημασία για τη δημόσια υγεία

Η ΚΑ του ανθρώπου, είναι ένα σημαντικό αναδυόμενο λοιμώδες νόσημα που εκδηλώνεται κυρίως με πυρετό, μυϊκό τρόμο, κεφαλαλγία και μυαλγία. Οι περισσότεροι ασθενείς εκτέθηκαν σε κρότωνες 1-2 εβδομάδες πριν από την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Η προχωρημένη ηλικία και οι



συνυπάρχουσες λοιμώξεις, αυξάνουν τη βαρύτητα της νόσου. Οι μισοί περίπου ασθενείς χρειάζονται νοσηλεία, ενώ σε ένα ποσοστό 17% από αυτούς απαιτείται νοσηλεία σε εντατική μονάδα. Αν και η θνησιμότητα είναι μικρή (0.5-1%), ενδέχεται να εμφανιστούν σημαντικές επιπλοκές της νόσου, όπως είναι η αναπνευστική ανεπάρκεια, οι ευκαιριακές λοιμώξεις από ιούς ή μύκητες, η ραβδομύωση, η οξεία νεφρική ανεπάρκεια και η απομυελινωτική πολυνευροπάθεια.⁵⁶ Στις Η.Π.Α

αναφέρονται περισσότερα από 700 περιστατικά κάθε χρόνο,⁶ ενώ στην Ευρώπη έχει διαπιστωθεί σε μικρό αριθμό ασθενών στην Αυστρία, την Ισπανία, την Ιταλία, τη Λεττονία, τη Νορβηγία, την Ολλανδία, την Πολωνία, και τη Σουηδία.⁵⁶ Στην Ελλάδα, το 20% των υγιών αιμοδοτών βρέθηκε να είναι οροθετικό στο *A. phagocytophilum*, ενώ, έξι, επιβεβαιωμένα με μοριακές μεθόδους, περιστατικά αναφέρθηκαν πρόσφατα στη Κρήτη.^{57,58}

> Βιβλιογραφία

- Lillini E, Macri G, Proietti G, Scarpulla M. New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1081: 360-370.
- Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 2010, 167: 108-122.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with *Anaplasma*, *Cowdria* with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, 51: 2145-2165.
- Pusterla N, Pusterla JB, Braun U, Lutz H. Experimental cross-infections with Ehrlichia phagocytophila and human granulocytic ehrlichia-like agent in cows and horses. *Vet Rec* 1999, 145: 311-314.
- Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002, 8: 763-772.
- Diniz PP, Breitschwerdt EB. *Anaplasma phagocytophilum* infection (Canine granulocytotropic anaplasmosis). In: Infectious diseases of the dog and cat. Greene CE (ed). 4th edn. Elsevier/Saunders: St. Louis, Missouri, 2012, pp. 244-254.
- Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med* 2009, 23: 1129-1141.
- Alberti A, Addis MF, Sparagano O, Zobba R, Chessa B, Cubeddu T, Parpaglia ML, Ardu M, Pittau M. *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. *Emerg Infect Dis* 2005, 11: 1322-1324.
- Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M. Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol* 1998, 12: 423-429.
- Leschnik M, Kirtz G, Viranyi Z, Wille-Piazza W, Duscher G. Acute granulocytic anaplasmosis in a captive timber wolf (*Canis lupus occidentalis*). *J Zoo Wildl Med* 2012, 43: 645-648.
- Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun* 2007, 31Suppl 1: 79-84.
- Bakken JS, Dumler S. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 2008, 22: 433-448.
- Bjoersdorff A, Bergstrom S, Massung RF, Haemig PD, Olsen B. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. *Emerg Infect Dis* 2001, 7: 877-879.
- Palomar AM, Santibanez P, Mazuelas D, Roncero L, Santibanez S, Portillo A, Oteo JA. Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis* 2012, 18: 1188-1191.
- Hildebrandt A, Franke J, Meier F, Sachse S, Dorn W, Straube E. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. *Ticks Tick Borne Dis* 2010, 1: 105-107.
- Little SE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010, 40: 1121-1140.
- Pusterla N, Braun U, Wolfensberger C, Lutz H. Intrauterine infection with Ehrlichia phagocytophila in a cow. *Vet Rec* 1997, 141: 101-102.
- Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Braun U, Lutz H. Laboratory findings in cows after experimental infection with Ehrlichia phagocytophila. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997, 4: 643-647.
- Plier ML, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Kidd LB. Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009, 45: 232-238.
- Stadtbaumer K, Leschnik MW, Nell B. Tick-borne encephalitis virus as a possible cause of optic neuritis in a dog. *Vet Ophthalmol* 2004, 7: 271-277.
- Domingos MC, Trotta M, Briand-Marchal A, Medaille C. Anaplasmosis in two dogs in France and molecular and phylogenetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Clin Pathol* 2011, 40: 215-221.
- Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci* 2011, 91: 71-76.
- Pusterla N, Pusterla JB, Deplazes P, Wolfensberger C, Muller W, Horauf A, Reusch C, Lutz H. Seroprevalence of Ehrlichia canis and of canine granulocytic Ehrlichia infection in dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1998, 36: 3460-3462.
- Shaw SE, Binns SH, Birtles RJ, Day MJ, Smithson R, Kenny MJ. Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 2005, 157: 645-648.
- Tabar MD, Francino O, Altet L, Sanchez A, Ferrer L, Roura X. PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. *Vet Rec* 2009, 164: 112-116.
- Manna L, Alberti A, Pavone LM, Scibelli A, Staiano N, Gravino AE. First molecular characterization of a granulocytic Ehrlichia strain isolated from a dog in South Italy. *Vet J* 2004, 167: 224-227.
- Gravino AE, De Caprariis D, Manna L, Cerundolo R, Sagazio P, Buonavoglia C. Preliminary report of infection in dogs related to Ehrlichia equi: description of three cases. *New Microbiol* 1997, 20: 361-363.
- Skotarczak B, Adamska M, Rymaszewska A, Supron M, Sawczuk M, Maciejewska A. [Anaplasma phagocytophila and protozoans of Babesia genus in dogs from endemic areas of



- Lyme disease in north-western Poland]. *Wiad Parazytol* 2004, 50: 555-561.
29. Santos AS, Alexandre N, Sousa R, Nuncio MS, Bacellar F, Dumler JS. Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec* 2009, 164: 168-171.
30. Majlathova V, Majlath I, Vichova B, Gul'ova I, Derdakova M, Sesztakova E, Pet'ko B. Polymerase chain reaction confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs suspected of babesiosis in Slovakia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, 11: 1447-1451.
31. Tozon N, Petrovec M, Avsic-Zupanc T. Clinical and laboratory features of the first detected cases of *A. phagocytophila* infections in dogs from Slovenia. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 990: 424-428.
32. Ravnik U, Tozon N, Smrdel KS, Zupanc TA. Anaplasmosis in dogs: the relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. *Vet Microbiol* 2011, 149: 172-176.
33. Johansson KE, Pettersson B, Uhlen M, Gunnarsson A, Malmqvist M, Olsson E. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. *Res Vet Sci* 1995, 58: 109-112.
34. Egenvall AE, Hedhammar AA, Bjoersdorff AI. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec* 1997, 140: 222-226.
35. Mylonakis ME, Koutinas AF, Baneth G, Polizopoulou Z, Fytianou A. Mixed *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, and presumptive *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog. *Vet Clin Pathol* 2004, 33: 249-251.
36. Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS, Kontos VS. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004, 40: 174-184.
37. Giadinis ND, Chochlakis D, Ioannou I, Kritsepi-Konstantinou M, Papadopoulos E, Psaroulaki A, Karatzias H. Haemorrhagic diathesis in a ram with *Anaplasma phagocytophilum* infection. *J Comp Pathol* 2011, 144: 82-85.
38. Kachrimanidou M, Papa A, Chochlakis D, Pavlidou V, Psaroulaki A. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks from Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, 11: 1391-1393.
39. Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 2008, 22: 1289-1295.
40. Egenvall A, Bonnett BN, Gunnarsson A, Hedhammar A, Shoukri M, Bornstein S, Artursson K. Sero-prevalence of granulocytic *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Swedish dogs 1991-94. *Scand J Infect Dis* 2000, 32: 19-25.
41. Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol* 1996, 34: 44-48.
42. Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *J Clin Microbiol* 2005, 43: 796-801.
43. Smith FD, Ballantyne R, Morgan ER, Wall R. Estimating Lyme disease risk using pet dogs as sentinels. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012, 35: 163-167.
44. Savic S, Vidić B, Lazic S, Lako B, Potkonjak A, Lepšanović Z. *Borrelia burgdorferi* in ticks and dogs in the province of Vojvodina, Serbia. *Parasite* 2010, 17: 357-361.
45. Pantchev N, Schaper R, Limousin S, Norden N, Weise M, Lorentzen L. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitol Res* 2009, 105 Suppl 1: S101-114.
46. Rymaszewska A, Adamska M. Molecular evidence of vector-borne pathogens coinfecting dogs from Poland. *Acta Vet Hung* 2011, 59: 215-223.
47. Eberts MD, Vissotto de Paiva Diniz PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011, 47: 86-94.
48. Granick JL, Armstrong PJ, Bender JB. *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc* 2009, 234: 1559-1565.
49. Cockwill KR, Taylor SM, Snead EC, Dickinson R, Cosford K, Malek S, Lindsay LR, Diniz PP. Granulocytic anaplasmosis in three dogs from Saskatoon, Saskatchewan. *Can Vet J* 2009, 50: 835-840.
50. Foley J, Drazenovich N, Leutenegger CM, Chomel BB. Association between polyarthritis and thrombocytopenia and increased prevalence of vectorborne pathogens in Californian dogs. *Vet Rec* 2007, 160: 159-162.
51. Kirtz G, Meli M, Leidinger E, Ludwig P, Thum D, Czettel B, Kolbl S, Lutz H. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog: identifying the causative agent using PCR. *J Small Anim Pract* 2005, 46: 300-303.
52. Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Litschi B, Parvis A, Lutz H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 2307-2309.
53. Chandrashekar R, Mainville CA, Beall MJ, O'Connor T, Eberts MD, Alleman AR, Gaunt SD, Breitschwerdt EB. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Am J Vet Res* 2010, 71: 1443-1450.
54. Mylonakis ME, Koutinas AF, Theodorou K, Siarkou VI, Kontos VI. Clinical relevance of serologic testing in canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Hellenic Vet Med Soc* 2012, 63: 127-134.
55. McCall JW, Baker CF, Mather TN, Chester ST, McCall SD, Irwin JP, Young SL, Cramer LG, Pollmeier MG. The ability of a topical novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene to protect dogs from *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections transmitted by *Ixodes scapularis*. *Vet Parasitol* 2011, 179: 335-342.
56. Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1078: 236-247.
57. Chochlakis D, Psaroulaki A, Kokkini S, Kostanatis S, Arkalati E, Karagrannaki E, Tsiatis K, Tselentis Y, Gikas A. First evidence of *Anaplasma* infection in Crete, Greece. Report of six human cases. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15 Suppl 2: 8-9.
58. Chochlakis D, Papaeustathiou A, Minadakis G, Psaroulaki A, Tselentis Y. A serosurvey of *Anaplasma phagocytophilum* in blood donors in Crete, Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008, 27: 473-475.

Canine granulocytic anaplasmosis in Europe:

an emerging tick-borne infectious disease



Apostolidis K.N.
DVM, PhD Candidate, Internal Medicine Clinic, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Thessaly

> Abstract

Anaplasma phagocytophilum, an intracellular, gram-negative aerobic bacterium, is the cause for granulocytic anaplasmosis in people, horses, dogs, cats, wolves, cattle and small ruminants. *A. phagocytophilum* mainly targets neutrophils and rarely eosinophilic granulocytes; in Europe it is transmitted by the tick *Ixodes ricinus*. A significant number of small mammals and deer comprise the reservoir for the microorganism in the wild. The majority of infected dogs remain asymptomatic, whereas those that develop clinical signs mostly present with non-specific signs like fever, depression or lethargy, anorexia and lameness. The most common laboratory finding of anaplasmosis is thrombocytopenia. Diagnosis is based on finding aggregates of the organism (morulae) in the cytoplasm of neutrophils, serological detection of specific antibodies and polymerase chain reaction. The treatment of choice is Doxycycline, administered per os at a dose of 5 mg/kg B.W./12 hours for 2-4 weeks.

> Etiology

Canine granulocytic anaplasmosis (GA) is caused by the bacterium *Anaplasma phagocytophilum* (order: Rickettsiales, family: Anaplasmataceae). Previously known as *Ehrlichia equi*, *A. phagocytophila* or the causative factor of granulocytic ehrlichiosis in people, this microorganism was renamed *A. phagocytophilum* after recent modifications to the classification of species in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae, based on the nucleotide sequence of 16S rRNA and groESL genes.¹⁻³ *A. phagocytophilum* includes multiple strains that differ in terms of their geographic location, the animal species they infect, and their infectious potential. For instance, strains that were isolated in Europe did not cause experimental disease in horses, and strains that were isolated from people in the U.S.A. failed to cause overt disease in cattle.⁴ Moreover, the rate of morbidity and mortality of human GA in Europe appears to be lower compared to that in the U.S.A.⁵

A. phagocytophilum are gram-negative, aerobic and obligatory intracellular bacteria, cocci or

curved rods in shape, and 0.2-2.0 µm in diameter. They mainly target neutrophils and rarely eosinophilic granulocytes. The microorganisms are located in the cytoplasm of infected cells within vacuoles formed by the cellular membrane, and they multiply by division, forming 20 or more bacteria. The latter aggregate, thus forming the typical morula with a 1.5-2.5 µm diameter.⁶

> Epidemiology

Up to the present day, infection caused by *A. phagocytophilum* has only been detected in the Northern hemisphere where ticks of the *Ixodes* genus (*I. persulcatus* complex) are the main intermediate hosts.^{6,7} In Europe, the main vector is *I. ricinus*, although the role that other species of ticks may play cannot be excluded. For example, in Sardinia, it was detected with polymerase chain reaction (PCR) in one of 50 (2%) examined ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus*.⁸ Trans-stadial transmission of the bacteria occurs

Saridomichelakis M.N.
DVM, PhD, Diplomate of the European College of Veterinary Dermatology, Associate Professor of Companion Animal Medicine, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Thessaly

Mylonakis M.E.
DVM, PhD, Assistant Professor of Companion Animal Medicine, Companion Animal Clinic, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki

Corresponding author:
Kosmas N. Apostolidis,
Internal Medicine, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Thessaly
224 Trikalon street, 43100, Karditsa, Greece
Phone number (+30) 2431 0 75038,
E-mail: kapostol@vet.uth.gr

Key words



- *Anaplasma phagocytophilum*,
- anaplasmosis,
- zoonosis,
- dog



in the tick,^{3,9} and natural reservoirs of the former include a variety of species, mostly wild rodents and ruminants (deer).¹

A. phagocytophilum has been identified by PCR in various species of mammals in nearly all European countries. Other than domestic ruminants, dogs, cats, horses, donkeys, European buffalo, red deer, elk, roe deer, wild boar, wolves, Eurasian lynxes, red foxes, hares, small rodents and men have also been found to be infected.^{10,11} However, the disease (GA) has been substantiated only in dogs, cats, horses, cattle, sheep, goats, people,⁶ and recently in wolves.^{6,10} It is worthy of note that since dogs and people are incidental hosts and develop bacteremia of a short duration (<28 days), their role as reservoirs of the bacterium does not seem to be crucial.¹² On the contrary, migratory birds may be of great epidemiological significance through the spreading of infected ticks across long distances.^{6,13-15}

On rare occasions, *A. phagocytophilum* transmission can be accomplished without the mediation of ticks.⁷ The above can occur through experimental inoculation or blood transfusion, and also through hospital-acquired infections as well as infection of people from deer carcasses during the skinning process.^{7,16} Transmission through the placenta has been proven in cattle in which *A. phagocytophilum* was also found in the white blood cells of milk, following experimental infection.^{17,18} However, in a recent case of a pregnant bitch with GA, no perinatal transmission of the bacteria was noted in any of the five puppies of that litter.¹⁹

The frequency of canine infection by *A. phagocytophilum* has been extensively studied based on serologic testing; however, few epidemiological studies are based on molecular methods. Comparison of results between studies is challenging

due to important differences in design (e.g. testing of samples from healthy or sick dogs, or from dogs admitted to primary veterinary clinics or second opinion clinics, and the season of sampling).⁶ Moreover, seropositivity does not exclusively reflect the exposure of dogs to *A. phagocytophilum*, since there may be serological cross-reactions with other *Anaplasma* species, such as *A. platys*.⁷ Despite the above limitations, the percentages of seropositive dogs in multiple European countries vary from 5% up to 70.5%,⁶ which renders canine GA an important emerging tick borne infectious disease. Furthermore, cases have been reported in Austria,²⁰ France,²¹ Germany,²² Switzerland,²³ the United Kingdom,²⁴ Spain,²⁵ Italy,^{26,27} Poland,²⁸ Portugal,²⁹ Slovakia,³⁰ Slovenia,^{31,32} and Sweden.^{33,34} In our country, GA has been diagnosed in some dogs based on cytological, serological, and molecular examinations,^{35,36} whereas bleeding diathesis was recently reported in a ram that was attributed to *A. phagocytophilum* infection based on serology results.³⁷ Finally, *A. phagocytophilum* DNA has been found in *I. ricinus* ticks.³⁸

Infection of dogs by *A. Phagocytophilum* and the development of overt clinical manifestations of GA depend on the season, age, breed and on other co-infections.⁷ In the U.S.A., GA is more commonly reported from spring to the beginning of summer as well as in autumn,⁶ whereas in Germany 17 out of 18 dogs were diagnosed between April and September.³⁹ The percentage of seropositive dogs increases with age;⁴⁰ the mean age of dogs with GA ranges between 6 and 8 years.^{34,39,41,42} About half of the infected dogs in one study were Golden Retrievers, whereas in other studies no breed predilection was noted.³⁴ Coexisting vector-borne infections can affect the clinical signs and laboratory findings of the disease.⁷ Coinfections by *A. phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* are common in North America⁶ as well as in Europe,⁴³⁻⁴⁶ since both of these organisms are transmitted by the same tick. Coinfections with microorganisms of the genera *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Rickettsia* and *Babesia* are also relatively common.⁷

> Pathogenesis

Ticks of the genus *Ixodes* need 24 to 48 hours from the moment of their attachment on the host to inoculation with *A. phagocytophilum*. The bacteria possess complex mechanisms employed to evade neutrophil defenses. Specifically, once they attach themselves to these cells with the aid of P-selectin (CD62-P) and enter the cytoplasm by endocytosis, they modify several fundamental neutrophil functions in order to survive and multiply. As a result, the phagolysosomal mechanism and the production of hydrogen peroxide in the phagosomes are blocked, the phagocytosing



**Table 1.** Frequency of clinical signs, based on selected reviews, in dogs with granulocytic anaplasmosis

	Reference (n=number of dogs)			
	Granick, 2009 ⁴⁸	Kohn, 2008 ³⁹	Eberts, 2011 ⁴⁷	Egenvall, 1997 ²¹
	(n=34)	(n=18)	(n=18)	(n=14)
Fever	27/32 (84%)	11/18 (61%)	16/18 (89%)	14/14(100%)
Depression or lethargy	25/34 (74%)	17/18 (94%)	13/18 (72%)	13/14 (93%)
Anorexia	21/34 (62%)	15/18 (83%)	NM	NM
Lymphadenomegaly	11/34 (32%)	NM	1/18 (6%)	NM
Splenomegaly	4/34 (12%)	17/18 (94%)	NM	NM
Neurological disorders	2/34 (6%)	NM	1/18 (6%)	NM
Arthropathy	2/34 (6%)	1/18 (6%)	10/18 (56%)	NM
Lameness	11/34 (32%)	2/18 (11%)	10/18 (56%)	NM
Tachypnea	10/34 (29%)	1/18 (6%)	NM	NM
Vomiting	8/34 (24%)	2/18 (11%)	1/18 (6%)	NM
Diarrhea	3/34 (9%)	3/18 (17%)	NM	NM
Abdominal pain	3/34 (9%)	5/18 (28%)	NM	NM
Petechiae	NM	2/18 (11%)	NM	NM
Melena	NM	1/18 (6%)	NM	NM
Epistaxis	NM	1/18 (6%)	1/18 (6%)	NM
Hemorrhagic vaginal discharge	NM	NM	NM	1/14 (7%)

NM: not mentioned

ability and attachment of neutrophils to the vascular endothelium are reduced, and the apoptosis of infected neutrophils is delayed.⁷

The incubation period of the disease ranges from one to two weeks; the responsible pathogenetic mechanisms have not yet been fully elucidated. These may include myelosuppression from produced cytokines, the abnormalities in hematopoietic stem cell maturation in the bone marrow, the immunological destruction of blood cells, the malfunction of neutrophils and the hyperconsumption of platelets.⁶

> Clinical signs and laboratory findings

Most infected dogs remain clinically healthy;⁷ in the opposite case, clinical signs of the acute disease develop. Although several dogs remain sub-clinical carriers of the microorganism for several months, the presence of a chronic disease similar to that of canine monocytic ehrlichiosis (*E. canis*) has not been proven in the case of GA. Moreover, up until the present day, mortal cases of canine GA have not been reported.⁶

The most typical clinical signs of canine GA (Table 1) are fever and depression or lethargy, noted in about 90% of cases;^{34,39,41,47,48} anorexia is also particularly common.^{41,42,48} Peripheral lymphad-

enomegaly is found in about 5-30% of cases, and splenomegaly at a percentage ranging from 10 to 100%, depending on the study.⁴⁹ Lameness due to polyarthritis, unwillingness to ambulate, and musculoskeletal pain are quite frequently reported,^{41,50} whereas rarer clinical manifestations include vomiting, diarrhea, abdominal pain,⁵⁰⁻⁵² polyuria, polydipsia, tachypnea, dyspnea, coughing, bleeding diathesis, uveitis and several neurological abnormalities such as seizures, ataxia, vestibular syndrome, and clinical signs of meningitis.

Thrombocytopenia is the most common laboratory abnormality, found in about 90% of affected dogs (Table 2). Mild non-regenerative anemia, increase or decrease in the number of white blood cells, lymphocytopenia, neutrophilia and neutropenia are noted less frequently. Hypoalbuminemia, hyperglobulinemia and a mild increase in the activity of liver enzymes (alkaline phosphatase and alanine aminotransferase) are the main serum chemistry abnormalities, whereas hyperbilirubinemia is less common.^{39,41,42,47,48}

> Diagnosis

Other than the case history (e.g. recent exposure to ticks) and compatible clinical and laboratory manifestations, the presence of GA is confirmed when one or more of the following criteria are observed, which ultimately comprise the

**Table 2.** Frequency of laboratory abnormalities, based on selected reviews, in dogs with granulocytic anaplasmosis

	Reference (n= number of dogs)			
	Granick, 2009 ⁴⁸	Kohn, 2008 ³⁹	Eberts, 2011 ⁴⁷	Egenvall, 1997 ²¹
	(n=34)	(n=18)	(n=18)	(n=14)
Anemia	16/34 (47%)	11/18 (61%)	12/18 (67%)	2/6 (33%)
Leucocytosis	6/34 (18%)	4/18 (22%)	NM	1/14 (7%)
Monocytosis	NM	7/18 (39%)	1/18 (6%)	0/14 (0%)
Leucopenia	3/34 (9%)	5/18 (28%)	10/18 (56%)	1/14 (7%)
Eosinopenia	NM	13/18(72%)	8/18 (44%)	11/14 (79%)
Lymphocytopenia	20/31 (65%)	9/18 (50%)	7/18 (39%)	X/14
Thrombocytopenia	21/22 (95%)	16/18 (89%)	17/18 (94%)	6/7 (86%)
Hypoalbuminemia	12/27 (44%)	12/18 67%)	NM	NM
↑ Alkaline phosphatase	14/27 (52%)	11/18(61%)	NM	1/7 (14%)
↑ Alanine aminotransferase	8/27 (30%)	2/18 (11%)	NM	0/10 (0%)
Hyperbilirubinemia	10/27 (37%)	5/18 (28%)	NM	NM

NM: not mentioned, (↑): increased activity, X: the exact number of dogs is not mentioned

foundation for the diagnostic algorithm of GA in people:⁷ (a) the presence of morulae inside neutrophils, along with a specific antibody titer determined by an indirect immunofluorescence assay (IFA) $\geq 1/80$, (b) a fourfold increase in antibody titer between a pair of serum samples obtained with a 3-4 week interim, (c) positive PCR using specific primers for *A. phagocytophilum*, or (d) isolation of *A. phagocytophilum* from blood by culture in specific cell lines.¹²

Cytological examination of peripheral blood or buffy coat smears dyed with Romanowsky-type stains (e.g. Diff-Quik, Giemsa) has a superior diagnostic sensitivity in the initial stages of GA, because morulae (Figure 1) can be detected in up to 32% of neutrophils.³⁵ Morulae appear four days after dogs are experimentally infected and remain in high numbers for 4-8 days. Differentiating morulae of *A. phagocytophilum* from *Ehrlichia ewingii*, which can also be located in neutrophils, is impossible under the optical microscope alone; this can only be accomplished with PCR.⁷

In clinical practice, diagnosing GA is usually based on detecting specific antibodies in a pair of serum samples obtained with a 3-4 week interim, because a fourfold increase in titer is a strong indication of active disease. On the contrary, isolated positive antibody titers do not confirm active infection, since they may be caused by a previous infection by *A. phagocytophilum* and persist for a long time (up to 12 months) after its eradication (treatment or spontaneous cure). Notably, the development of symptoms in GA may precede the presence of a detectable antibody titer.⁷ For example, with IFA the IgG immunoglobulins can be detected

in about eight days from infection and 2-5 days after the appearance of morulae in neutrophils. Nowadays, an in-clinic immunoenzymatic serologic test (ELISA) is commercially available, utilizing recombinant protein Msp2/p44 for a qualifying estimation (positive or negative result) of the presence or not of antibodies against *A. phagocytophilum*.⁵³ Using this test, cross-reactivity between *A. phagocytophilum* and *A. platys* has been reported, but not with *E. canis*.^{53,54}

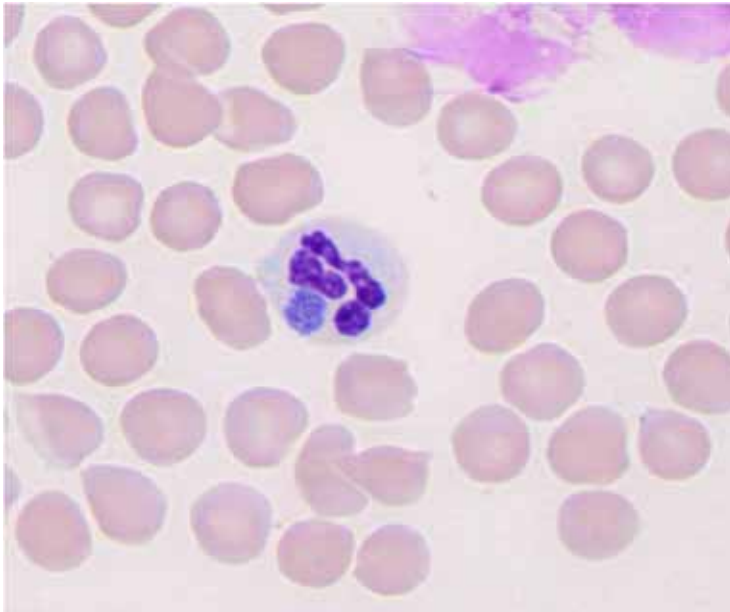
Conventional PCR and real-time PCR, combined with nucleotide sequencing, have a high diagnostic sensitivity and specificity and have been used to trace DNA of *A. phagocytophilum* in the blood, bone marrow and spleen.⁷ A negative result does not rule out infection, since the number of bacteria in the sample may be less than the diagnostic threshold, which can be expected after administration of antimicrobial drugs.¹⁶

A. phagocytophilum can be isolated by blood culture in human promyelocytic leukemia cell lines (HL-60) or in tick embryo cell lines. Despite its superior diagnostic sensitivity, this method is usually applied in research and not in the clinical setting.⁷

> Treatment and prognosis

The treatment of choice for canine GA is Doxycycline per os at a dose of 5 mg/kg B.W., every 12 hours for 2-4 weeks.^{6,7} Most dogs show clinical improvement within 24-48 hours after the initiation of treatment,⁷ although it has not yet been clarified whether this treatment leads to a microbiological cure. Other antimicrobials





Special thanks to Andrew Graham Burton, DVM (School of Veterinary Medicine, UC Davis, California, USA) for courteously providing Figure 1.

Figure 1. Morula of *Anaplasma phagocytophilum* in the cytoplasm of a neutrophil in a canine peripheral blood smear (Photo courtesy of Andrew Graham Burton, DVM, School of Veterinary Medicine, UC Davis, California, USA)

sufficient for clinical improvement are fluoroquinolones (e.g. enrofloxacin, levofloxacin)^{6,16} and rifampicin, which has been previously used against the same disease in people.¹⁶

Given that there is no vaccine against *A. phagocytophilum*, prevention is based on avoidance of dog exposure to ticks, manual removal of the latter by special forceps, regular use of ectoparasiticides (e.g. fipronil, amitraz, pyrethroids) and the possible pre-emptive administration of doxycycline for a few days if dogs are to travel to endemic regions.^{6,16,22,55}

> Public health significance

Human GA is an important emerging infectious disease, mainly manifesting with fever, muscular tremors, headaches and myalgia. Most patients

are exposed to ticks 1-2 weeks prior to developing clinical symptoms. Advanced age and co-existing infections increase the severity of the disease. Approximately half of the patients need to be hospitalized, whereas 17% will require intensive care. Although mortality is low (0.5-1%), significant complications of the disease may occur, such as respiratory failure, opportunistic viral or fungal infections, rhabdomyolysis, acute renal failure and demyelinating polyneuropathy.⁵⁶ In the U.S.A., more than 700 cases are reported each year.⁶ In Europe, Austria, Spain, Italy, Latvia, Norway, Netherlands, Poland, and Sweden have recorded a small number of patients;⁵⁶ in Greece, 20% of healthy blood donors have been found to be seropositive to *A. phagocytophilum*, whereas six cases confirmed by molecular methods were recently reported in Crete.^{57,58}

> References

1. Lillini E, Macri G, Proietti G, Scarpulla M. New findings on anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann NY Acad Sci* 2006, 1081: 360-370.
2. Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 2010, 167: 108-122.
3. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective

synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, 51: 2145-2165.

4. Pusterla N, Pusterla JB, Braun U, Lutz H. Experimental cross-infections with *Ehrlichia phagocytophila* and human granulocytic ehrlichia-like agent in cows and horses. *Vet Rec* 1999, 145: 311-314.
5. Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002, 8: 763-772.
6. Diniz PP, Breitschwerdt EB. *Anaplasma phagocytophilum* infection (Canine granulocytotropic anaplasmosis). In: *Infectious diseases of the dog and cat*. Greene CE (ed). 4th edn. Elsevier/Saunders: St. Luis, Missouri, 2012, pp. 244-254.
7. Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. Canine



- granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med* 2009, 23: 1129-1141.
8. Alberti A, Addis MF, Sparagano O, Zobba R, Chessa B, Cubeddu T, Parpaglia ML, Ardu M Pittau M. *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. *Emerg Infect Dis* 2005, 11: 1322-1324.
 9. Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M. Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol* 1998, 12: 423-429.
 10. Leschnik M, Kirtz G, Viranyi Z, Wille-Piazzai W, Duscher G. Acute granulocytic anaplasmosis in a captive timber wolf (*Canis lupus occidentalis*). *J Zoo Wildl Med* 2012, 43: 645-648.
 11. Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun* 2007, 31Suppl 1: 79-84.
 12. Bakken JS, Dumler S. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 2008, 22: 433-448.
 13. Bjoersdorff A, Bergstrom S, Massung RF, Haemig PD, Olsen B. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. *Emerg Infect Dis* 2001, 7: 877-879.
 14. Palomar AM, Santibanez P, Mazuelas D, Roncero L, Santibanez S, Portillo A, Oteo JA. Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis* 2012, 18: 1188-1191.
 15. Hildebrandt A, Franke J, Meier F, Sachse S, Dorn W, Straube E. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. *Ticks Tick Borne Dis* 2010, 1: 105-107.
 16. Little SE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010, 40: 1121-1140.
 17. Pusterla N, Braun U, Wolfensberger C, Lutz H. Intrauterine infection with Ehrlichia phagocytophila in a cow. *Vet Rec* 1997, 141: 101-102.
 18. Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Braun U, Lutz H. Laboratory findings in cows after experimental infection with Ehrlichia phagocytophila. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997, 4: 643-647.
 19. Plier ML, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Kidd LB. Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *J Am Anim Hosp Assoc* 2009, 45: 232-238.
 20. Stadtbaumer K, Leschnik MW, Nell B. Tick-borne encephalitis virus as a possible cause of optic neuritis in a dog. *Vet Ophthalmol* 2004, 7: 271-277.
 21. Domingos MC, Trotta M, Briand-Marchal A, Medaille C. Anaplasmosis in two dogs in France and molecular and phylogenetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Clin Pathol* 2011, 40: 215-221.
 22. Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci* 2011, 91: 71-76.
 23. Pusterla N, Pusterla JB, Deplazes P, Wolfensberger C, Muller W, Hauruf A, Reusch C, Lutz H. Seroprevalence of Ehrlichia canis and of canine granulocytic Ehrlichia infection in dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1998, 36: 3460-3462.
 24. Shaw SE, Binns SH, Birtles RJ, Day MJ, Smithson R, Kenny MJ. Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 2005, 157: 645-648.
 25. Tabar MD, Francino O, Altet L, Sanchez A, Ferrer L, Roura X. PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. *Vet Rec* 2009, 164: 112-116.
 26. Manna L, Alberti A, Pavone LM, Scibelli A, Staiano N, Gravino AE. First molecular characterization of a granulocytic Ehrlichia strain isolated from a dog in South Italy. *Vet J* 2004, 167: 224-227.
 27. Gravino AE, De Caprariis D, Manna L, Cerundolo R, Sagazio P, Buonavoglia C. Preliminary report of infection in dogs related to Ehrlichia equi: description of three cases. *New Microbiol* 1997, 20: 361-363.
 28. Skotarczak B, Adamska M, Rymaszewska A, Supron M, Sawczuk M, Maciejewska A. [Anaplasma phagocytophila and protozoans of Babesia genus in dogs from endemic areas of Lyme disease in north-western Poland]. *Wiad Parazytol* 2004, 50: 555-561.
 29. Santos AS, Alexandre N, Sousa R, Nuncio MS, Bacellar F, Dumler JS. Serological and molecular survey of Anaplasma species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec* 2009, 164: 168-171.
 30. Majlathova V, Majlath I, Vichova B, Gul'ova I, Derdakova M, Sesztakova E, Pet'ko B. Polymerase chain reaction confirmation of Babesia canis canis and Anaplasma phagocytophilum in dogs suspected of babesiosis in Slovakia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, 11: 1447-1451.
 31. Tozon N, Petrovec M, Avsic-Zupanc T. Clinical and laboratory features of the first detected cases of A. phagocytophila infections in dogs from Slovenia. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 990: 424-428.
 32. Ravnik U, Tozon N, Smrdel KS, Zupanc TA. Anaplasmosis in dogs: the relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. *Vet Microbiol* 2011, 149: 172-176.
 33. Johansson KE, Pettersson B, Uhlen M, Gunnarsson A, Malmqvist M, Olsson E. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. *Res Vet Sci* 1995, 58: 109-112.
 34. Egenvall AE, Hedhammar AA, Bjoersdorff AI. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec* 1997, 140: 222-226.
 35. Mylonakis ME, Koutinas AF, Baneth G, Polizopoulou Z, Fytianou A. Mixed Ehrlichia canis, Hepatozoon canis, and presumptive Anaplasma phagocytophilum infection in a dog. *Vet Clin Pathol* 2004, 33: 249-251.
 36. Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS, Kontos VS. Chronic canine ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004, 40: 174-184.
 37. Giadinis ND, Chochlakis D, Ioannou I, Kritsepi-Konstantinou M, Papadopoulos E, Psaroulaki A, Karatzias H. Haemorrhagic diathesis in a ram with Anaplasma phagocytophilum infection. *J Comp Pathol* 2011, 144: 82-85.
 38. Kachrimanidou M, Papa A, Chochlakis D, Pavlidou V, Psaroulaki A. Molecular evidence for Anaplasma phagocytophilum in Ixodes ricinus ticks from Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, 11: 1391-1393.
 39. Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 2008, 22: 1289-1295.
 40. Egenvall A, Bonnett BN, Gunnarsson A, Hedhammar A, Shoukri M, Bornstein S, Artursson K. Seroprevalence of granulocytic Ehrlichia spp. and Borrelia burgdorferi sensu lato in Swedish dogs 1991-94. *Scand J Infect Dis* 2000, 32: 19-25.
 41. Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol* 1996, 34: 44-48.
 42. Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK. Genetic variants of Anaplasma phagocytophilum infecting dogs in Western Washington State. *J Clin Microbiol* 2005, 43: 796-801.
 43. Smith FD, Ballantyne R, Morgan ER, Wall R. Estimating



Lyme disease risk using pet dogs as sentinels. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012, 35: 163-167.

44. Savić S, Vidić B, Lazić S, Lako B, Potkonjak A, Lepšanić Z. *Borrelia burgdorferi* in ticks and dogs in the province of Vojvodina, Serbia. *Parasite* 2010, 17: 357-361.

45. Pantchev N, Schaper R, Limousin S, Norden N, Weise M, Lorentzen L. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitol Res* 2009, 105 Suppl 1: S101-114.

46. Rymaszevska A, Adamska M. Molecular evidence of vector-borne pathogens coinfecting dogs from Poland. *Acta Vet Hung* 2011, 59: 215-223.

47. Eberts MD, Vissotto de Paiva Diniz PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011, 47: 86-94.

48. Granick JL, Armstrong PJ, Bender JB. *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc* 2009, 234: 1559-1565.

49. Cockwill KR, Taylor SM, Snead EC, Dickinson R, Cosford K, Malek S, Lindsay LR, Diniz PP. Granulocytic anaplasmosis in three dogs from Saskatoon, Saskatchewan. *Can Vet J* 2009, 50: 835-840.

50. Foley J, Drazenovich N, Leutenegger CM, Chomel BB. Association between polyarthritis and thrombocytopenia and increased prevalence of vectorborne pathogens in Californian dogs. *Vet Rec* 2007, 160: 159-162.

51. Kirtz G, Meli M, Leidinger E, Ludwig P, Thum D, Czettel B, Kolbl S, Lutz H. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog: identifying the causative agent using PCR. *J Small Anim Pract*

2005, 46: 300-303.

52. Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Litschi B, Parvis A, Lutz H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 2307-2309.

53. Chandrashekar R, Mainville CA, Beall MJ, O'Connor T, Eberts MD, Alleman AR, Gaunt SD, Breitschwerdt EB. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Am J Vet Res* 2010, 71: 1443-1450.

54. Mylonakis ME, Koutinas AF, Theodorou K, Siarkou VI, Kontos VI. Clinical relevance of serologic testing in canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Hellenic Vet Med Soc* 2012, 63: 127-134.

55. McCall JW, Baker CF, Mather TN, Chester ST, McCall SD, Irwin JP, Young SL, Cramer LG, Pollmeier MG. The ability of a topical novel combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene to protect dogs from *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections transmitted by *Ixodes scapularis*. *Vet Parasitol* 2011, 179: 335-342.

56. Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1078: 236-247.

57. Chochlak D, Psaroulaki A, Kokkini S, Kostanatis S, Arkalati E, Karagrannaki E, Tsiatis K, Tselentis Y, Gikas A. First evidence of *Anaplasma* infection in Crete, Greece. Report of six human cases. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15 Suppl 2: 8-9.

58. Chochlak D, Papaeustathiou A, Minadakis G, Psaroulaki A, Tselentis Y. A serosurvey of *Anaplasma phagocytophilum* in blood donors in Crete, Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008, 27: 473-475.

1 ΠΕΡΙΟΡΙΖΕΙ ΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ

2 ΔΕΣΜΕΥΕΙ ΤΙΣ ΟΥΡΑΙΜΙΚΕΣ ΤΟΞΙΝΕΣ

3 ΒΟΗΘΑ ΣΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΝΕΦΡΩΝ

4 ΣΥΜΒΑΛΛΕΙ ΣΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ



Pronefra®

Εξοπλιστείτε καλύτερα
για να αντιμετωπίσετε
τη Χρόνια Νεφρική
Ανεπάρκεια



Πόσιμο εναιώρημα

Virbac