

# Diagnostika anaplasmózy psa pomocí PCR a stanovení specifických protilátek

J. KONVALINOVA,<sup>1</sup> V. SVOBODOVÁ,<sup>2</sup> M. SVOBODA<sup>1</sup><sup>1</sup>Klinika chorob psů a koček FVL VFU Brno<sup>2</sup>Ústav patologické morfologie a parazitologie FVL VFU Brno

## SOUHRN

Konvalinová J., Svobodová V., Svoboda M. **Diagnostika anaplasmózy psa pomocí PCR a stanovení specifických protilátek.** Veterinární klinika 2012;9:163-168.

Od října 2008 do listopadu 2010 bylo vyšetřeno 438 vzorků krve od 330 psů. Bylo provedeno PCR vyšetření na zjištění přítomnosti DNA *A. phagocytophilum* a sérologické vyšetření na přítomnost protilátek proti *A. phagocytophilum*. Přítomnost DNA *A. phagocytophilum* byla prokázána u 27 zvířat (8,2 %). U 161 zvířat (48,8 %) byla zjištěna přítomnost specifických protilátek. Titry se pohybovaly v rozmezí od 160 do 40 960. Mezi hlavní klinické příznaky DNA pozitivních psů patřila apatie, nechutenství a horečka. Z laboratorních vyšetření byla nejčastějším nálezem trombocytopenie. V práci je prezentován případ klinické anaplasmózy psa.

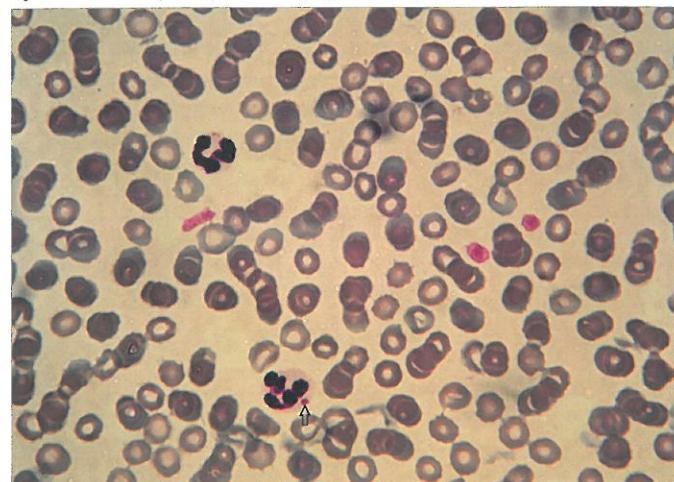
## SUMMARY

Konvalinová J., Svobodová V., Svoboda M. **Diagnostics of anaplasmosis in a dog by PCR method and determination of specific antibodies.** Veterinární klinika 2012;9:163-168.

From October 2008 to November 2010 were examined 438 blood samples from 330 dogs. PCR tests were performed to detect the presence of DNA of *A. phagocytophilum* and serological testing for antibodies against *A. phagocytophilum*. The presence of DNA of *A. phagocytophilum* was demonstrated in 27 animals (8.2 %). In 161 animals (48.8 %) was detected the presence of specific antibodies. The titers ranged from 160 to 40 960. To the main clinical signs of DNA-positive dogs belonged apathy, loss of appetite and fever. From laboratory examinations, thrombocytopenia was the most frequent finding. This study presents a clinical case of anaplasmosis in a dog.

## Úvod

Anaplasmóza je infekční onemocnění, jehož původcem je obligátní intracelulární bakterie *Anaplasma phagocytophilum* z řádu *Rickettsiales*. Tato pleomorfní gramnegativní bakterie infikuje buňky pocházející z kostní dřeně. Infikuje především neutrofily, ale je možné ji výjimečně detektovat v eozinofilech nebo monocytech. V cytoplazmě těchto buněk vytváří bazofilní intracytoplazmatická tělíska – tzv. moruly (obr. 1). Onemocnění je rozšířeno celosvětově a bylo zjištěno u celé řady živočišných druhů. V Evropě byla infekce psů poprvé popsána v 80. letech 20. století



Obr. 1 – Moruly *A. phagocytophilum* v neutrofilech (barvení Hemacolor, zvětšení 1000x)

ve Švýcarsku a Švédsku. V 90. letech minulého století bylo zjištěno, že tato bakterie může vyvolávat onemocnění i u lidí. Vektorem tohoto onemocnění jsou klíšťata z čeledi *Ixodidae*. V Evropě se nejvíce uplatňuje hojně rozšířený druh *Ixodes ricinus*. Jako rezervoárová zvířata se uplatňují především domácí a volně žijící přežívavci – ovce, kozy a vysoká zvěř. U zvířat i lidí může tato infekce probíhat asymptomaticky, s různě výraznou symptomatologií nebo může vyústit až v multiorgánové selhání s fatálním průběhem. Obecně lze říci, že se toto onemocnění nejčastěji prezentuje jako akutní febrilní syndrom – zvířata vykazují horečku, apatií a nechutenství. Další klinické příznaky většinou souvisí s postižením pohybového, nervového, trávicího a dýchacího aparátu. V rámci hematologického vyšetření je nejčastějším a typickým nálezem trombocytopenie. Mohou být vyjádřeny změny v počtu leukocytů a mírná anémie. Při hodnocení biochemického vyšetření krve se setkáváme nejčastěji s elevací jaterních enzymů. Ostatní parametry nevykazují signifikantní odchylky od fyziologického rozmezí. Bakteriemie trvá obvykle 1–2 týdny. Protilátky se tvoří do dvou týdnů po infekci, IgM dominují první tři týdny, IgG se vytváří později a v krvi přetrávají několik týdnů i měsíců.

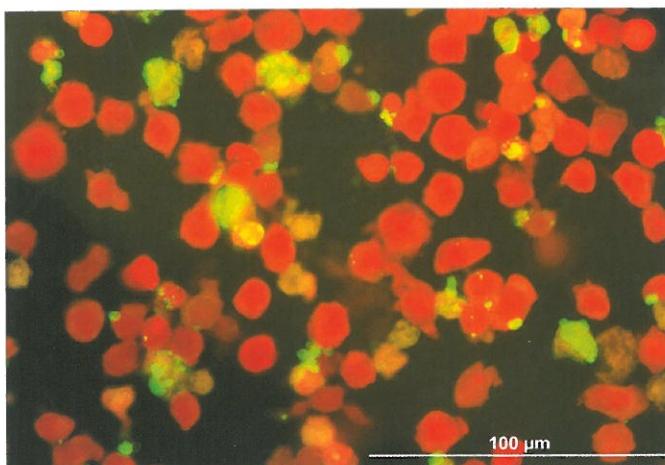
## Materiál a metodika

Od října 2008 do listopadu 2010 bylo vyšetřeno 438 vzorků krve od 330 psů (25 psů bylo odebíráno opakovně) 99 plemen a kříženců. V souboru bylo 183 psů, z toho

13 samčích kastrátů, 147 fen, z toho 42 kastrovaných. Věk vyšetřených zvířat se pohyboval od dvou měsíců do 17 let. Hmotnost těchto zvířat kolísala od 2 do 92 kg. Do souboru byli zařazeni psi zdraví a psi s různými klinickými příznaky onemocnění. U většiny psů bylo provedeno hematologické a biochemické vyšetření krve. Vyšetřovaní psi byli pacienty Kliniky chorob psů a koček FVL VFU a pocházeli převážně z Brna a Jihomoravského kraje. Krev byla odebírána z *v. cephalica antebrachii* nebo *v. jugularis*. Od každého psa byly získány vzorky plné krve (odběr na EDTA) a krevního séra. Vzorky plné krve byly vyšetřeny metodou PCR. DNA byla ze vzorků extrahována komerčním kitem QIAGEN NucleoSpin Blood (Machery-Nagel, Germany) podle pokynů výrobce.

Použité primery a postupy vyšetření byly provedeny v souladu s metodikou Walls et al.<sup>17</sup> Jako pozitivní kontrola byla použita DNA pozitivního psa.

K sérologickému vyšetření byl použit komerční kit *Anaplasma phagocytophila* IFA Canine IgG Antibody Kit (Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA) podle návodu výrobce a za pozitivní byly považovány titry vyšší než 80 (obr. 2).



Obr. 2 – Sérologické vyšetření (IFA) – *A. phagocytophilum* – pozitivní výsledek

Hematologické a biochemické vyšetření krve bylo provedeno v Centrální klinické laboratoři FVL VFU Brno.

## Výsledky

Přítomnost DNA *A. phagocytophilum* v tomto souboru 330 zvířat byla prokázána u 27 jedinců (8,2 %).

Z celkového počtu 330 psů jich bylo sérologicky vyšetřeno 328. U 161 zvířat (48,8 %) byla zjištěna přítomnost specifických protilátek proti *A. phagocytophilum*. Z těchto 161 sérologicky pozitivních zvířat bylo 73 fen (tj. 49,7 procenta z celkového počtu 147 vyšetřených fen) a 88 psů (tj. 48,1 % z celkového počtu 183 vyšetřených psů – samců). Titry se pohybovaly v rozmezí od 160 do 40 960. Sérologicky negativních bylo 167 psů (50,6 %).

Nejvyšší titr 40 960 byl naměřen celkem 3x, a to v měsících dubnu, květnu a červnu. Titr 20 480 celkem 7x v měsících březnu, květnu, červnu, září a listopadu.

Výsledky PCR a sérologického vyšetření u skupiny zdravých psů a skupiny psů s různými klinickými příznakami

Tab. 1 – Výsledky PCR vyšetření u skupiny psů zdravých a psů s klinickými příznaky onemocnění (n = 330)

Výsledek vyšetření	Psi klinicky zdraví		Psi s klinickými příznaky onemocnění	
	počet	procento	počet	procento
PCR pozitivní	6	8,7	21	8
PCR negativní	63	91,3	240	92
Celkem	69	100	261	100

Tab. 2 – Výsledky sérologického vyšetření u skupiny psů zdravých a psů s klinickými příznaky onemocnění (n = 328)

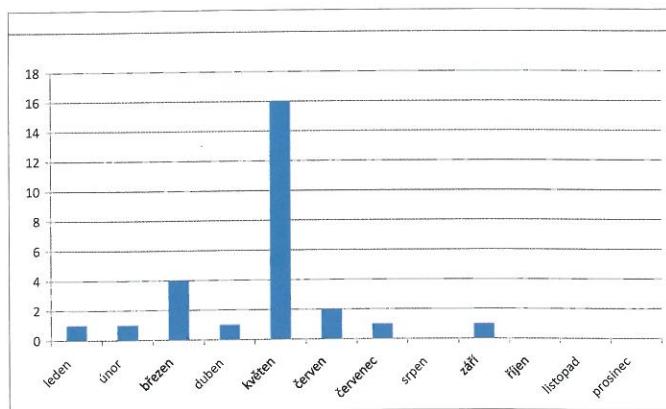
Výsledek vyšetření	Psi klinicky zdraví		Psi s klinickými příznaky onemocnění	
	počet	procento	počet	procento
Sérologicky pozitivní	39	56,5	122	47,1
Sérologicky negativní	30	43,5	137	52,9
Celkem	69	100	259	100

ky onemocnění shrnuje tabulka 1 a 2. S použitím Chi kvadrát testu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinou psů klinicky zdravých a nemocných.

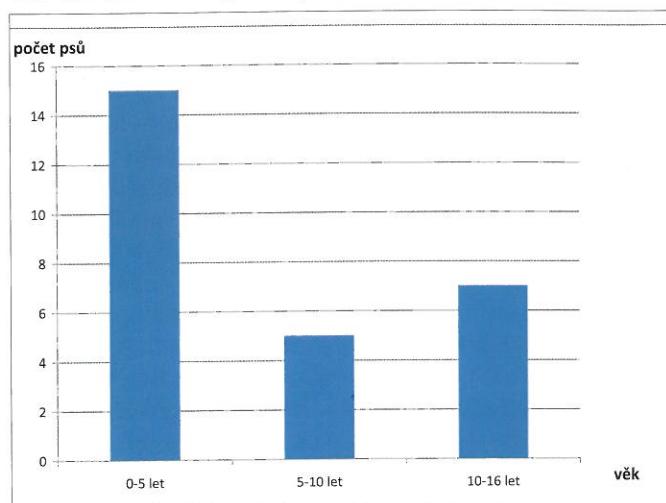
Nyní se zaměříme na skupinu 27 psů, u kterých byla prokázána v krvi DNA *A. phagocytophilum*. Sérologické vyšetření této skupiny 27 psů na přítomnost specifických IgG protilátek bylo negativní ve 12 případech (46,2 %), 14 psů (53,8 %) bylo sérologicky pozitivních (titry se pohybovaly od 160 do 10 240) a jeden pes nebyl sérologicky vyšetřen. Jednalo se o psy 22 plemen a křížence. Věk se pohyboval od 2 měsíců do 16 let. V souboru převažovali samci (20 zvířat – 74 %, z toho dva kastrati). Fen bylo 7 (26 %), z toho tři kastrované. U 13 psů (48,2 %) byly pozorovány klinické příznaky odpovídající symptomatologii anaplasmózy. Jednalo se o apatii, horečku, nechutenství, neurologické potíže ve formě záchvatů, paréz nebo plegií a gastrointestinální potíže (zvracení, průjem) – viz tab. 3. Jeden pes měl zároveň prokázanou babesiozu jako stěžejní diagnózu a v tomto případě se klinické příznaky překrývaly. Šest psů (22,2 %) nejelo žádné příznaky onemocnění. U osmi psů (29,6 %) byla stanovena diagnóza nesouvisející s infekcí anaplasmiemi. Dva z těchto psů měli prokázanou nádorové onemocnění (histiocytární sarkom a tumor sleziny). U třech psů vykazujících apatii a horečku byla prokázána splenome-

Tab. 3 – Incidence klinických příznaků u psů s nálezem DNA *A. phagocytophilum* (n = 27)

Klinické příznaky	Počet psů	Procento
Apatie	11	40,7
Nechutenství	12	44,4
Horečka	7	25,9
Neurologické potíže	6	22,2
Zažívací potíže	1	3,7



Graf 1 – Počet PCR pozitivních psů v jednotlivých měsících v roce 2009 a 2010 (n = 27)



Graf 2 – Věkové zastoupení PCR pozitivních psů (n = 27)

Tab. 4 – Incidence laboratorních nálezů u psů s pozitivním záchytem DNA *A. phagocytophilum* (n = 22)

Laboratorní nálezy	Počet psů	Procento
Trombocytopenie	8	36,4
Leukopenie	3	13,6
Leukocytóza	3	13,6
Anémie	4	18,1
Zvýšená aktivita jaterních enzymů (ALT, AST, ALP)	12	54,5

Tab. 5 – Incidence laboratorních nálezů u psů s klinickými příznaky souvisejícími s anaplasmózou a u psů vykazujících klinické příznaky nesouvisející s anaplasmózou (n = 22)

Laboratorní nálezy	Psi s klinickými příznaky souvisejícími s anaplasmózou	Psi s klinickými příznaky nesouvisejícími s anaplasmózou
Trombocytopenie	7	1
Anémie	2	2
Leukopenie	3	0
Leukocytóza	1	2
Zvýšené aktivity ALT	6	4
Zvýšené aktivity ALP	4	3

galie a lymfadenopatie. Nejvíce záchytů bylo v obou letech v měsíci květnu (16) a březnu (4) – viz graf 1. Zastoupení věkových kategorií ukazuje graf 2.

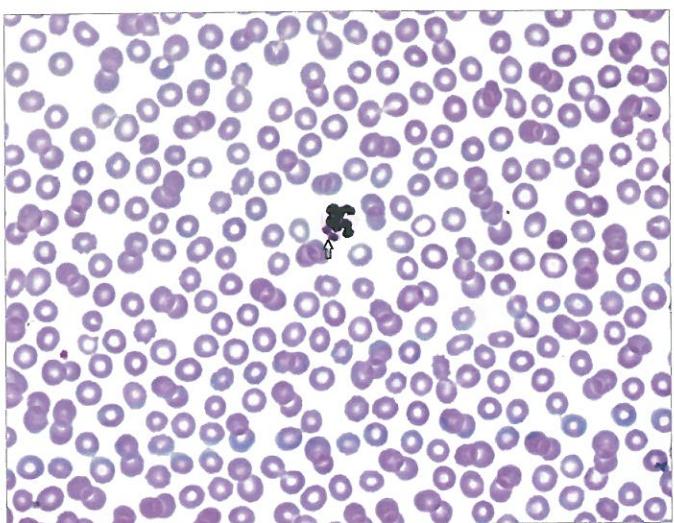
Hematologické a biochemické vyšetření bylo provedeno u 22 psů. Snížený počet trombocytů byl zjištěn u osmi psů, hodnoty se pohybovaly od  $26.10^9/l$  do  $134.10^9/l$ . Pět psů s trombocytopenií mělo zároveň horečku. Dále byla zjištěna u některých zvířat leukopenie, leukocytóza, anémie a zvýšená aktivita jaterních enzymů (ALT, AST, ALP). Laboratorní nálezy jsou shrnutы v tabulce 4. Tabulka 5 ukazuje laboratorní nálezy u psů s klinickými příznaky souvisejícími s anaplasmózou a u psů vykazujících klinické příznaky nesouvisející s anaplasmózou.

## Průběh klinické anaplasmózy

V tabulce 6 je zachycen průběh anaplasmózy u psa plemene Chesapeake Bay retrív (pohlaví samčí, stáří jeden rok), který byl na kliniku přiveden 8. 6. 2010 s náhlým nástupem horečky, apatie a nechutenství. Trombocytopenie byla zjištěna jen v prvních čtyřech dnech onemocnění, kdy byly v neutrofilech současně přítomny i moruly (obr. 3). Počet neutrofilů s těmito inkluzem dosáhl v krevním nátretu 15 %. Pozitivní výsledek PCR (obr. 4) se shodoval s výskytem morul v neutrofilech. K úpravě počtu trombocytů došlo ve velmi krátké době. Za šest dní od začátku onemocnění byly jejich počty opět ve fyziologickém rozmezí. Celkový počet leukocytů byl sice v akutní fázi onemocnění mírně snížený, ale jednalo se spíše o hodnoty hraniční. Erytrocyty nevykazovaly významné odchylky od normy a rovněž stanované biochemické parametry byly v rámci fyziologického rozmezí. Specifické protilátky byly poprvé zachyceny 13. den po propuknutí onemocnění. Dosáhly titru 2560 a tento titr přetrával až do 7. 7. 2010. Poslední sérologické vyšetření bylo provedeno ještě 21. 7. 2010 (43 dní od začátku onemocnění) a ukázalo hladinu protilátek v titru 1280. Od 9. 6. 2010 (2. den od začátku onemocnění) byl podáván doxycyklin v dávce 10 mg/kg 1x denně.

## Diskuse

Z celkového počtu 328 sérologicky vyšetřených psů byly IgG specifické protilátky proti *A. phagocytophilum* nalezeny u 161 zvířat, což činí 48,8 %. V porovnání s předchozími studiemi, které na našem území sledovaly zastoupení sérologicky pozitivních jedinců, jsou námi zjištěné počty vyšší. Spejchalová et al.<sup>16</sup> uvádějí 17,4 % a Kybicová et al.<sup>9</sup> 26 % sérologicky pozitivních psů. Počty pozitivních zvířat závisí na možnosti setkat se s vektorem a na přítomnosti patogenního agens v organismu vektoru. V Evropě se počet klíšťat, u kterých byla prokázána DNA *A. phagocytophilum*, pohybuje od 0,4 do 66,7 %.<sup>2</sup> Bohužel nemáme data o infikovanosti klíšťat na jižní Moravě. V našem souboru jednoznačně převažovali psi pocházející z Brna a nejbližšího okolí. Je pravděpodobné, že se počty pozitivních zvířat budou lišit v jednotlivých oblastech v závislosti na četnosti výskytu a infikovanosti vektorů, se kterými psi přicházejí do styku. Nasávací oblast Brněnska a zejména Hodonínska patří mezi regio-



Obr. 3 – Moruly *A. phagocytophilum* v neutrofilech (barvení Hemacolor, zvětšení 1000x)

ny s optimálními podmínkami pro výskyt klíšťat. Na základě našeho výsledku 48,8 % sérologicky pozitivních psů lze konstatovat, že u námi vyšetřovaných zvířat docházelo k poměrně častému styku s patogenem. Tato data mají význam i pro zhodnocení nebezpečí možné infekce člověka.

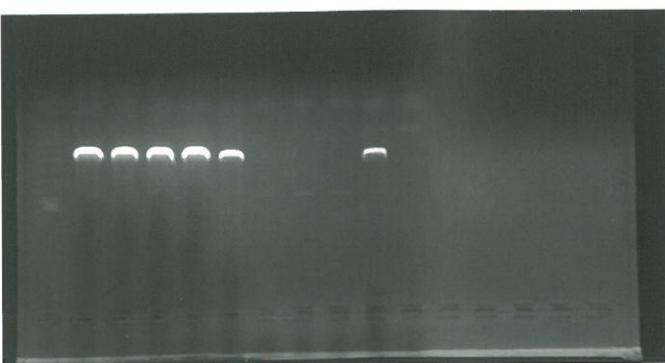
V naší studii nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v zastoupení pohlaví mezi sérologicky pozitivními jedinci. V souboru jsme měli zvířata, která byla na kliniku přivedena s klinickými příznaky onemocnění a zvířata klinicky zdravá. Porovnáním těchto dvou skupin jsme zjistili vyšší zastoupení sérologicky pozitivních jedinců u zvířat zdravých (56,5 %) oproti zvířatům vykazujícím klinické příznaky onemocnění (47,1 %), nejdalo se však o rozdíl statisticky významný. Tento výsledek může potvrzovat také fakt, že anaplasmóza probíhá v našich podmírkách častěji asymptomaticky.

Titry specifických IgG protilátek se pohybovaly v rozmezí od 160 do 40 960. Nejvyšší titr byl naměřen třikrát, a to v měsících dubnu, květnu a červnu. Titr 20 480 byl zjištěn celkem 7x, a to v měsících březnu, květnu, červnu, září a listopadu. Tyto výsledky logicky souvisí s nástupem aktivity klíšťat. Porovnáním hodnot titrů specifických protilátek v průběhu roku jsme prokázali, že tyto titry dosahovaly statisticky vyšších hodnot v podzimních (září, říjen, listopad) měsících (Wilcoxonův neparametrický test,  $p = 0,025782$ ).

Z celkového počtu 330 vyšetřených zvířat jsme zachytily DNA *A. phagocytophilum* u 27 psů, což představuje 8,2 %. Tento výsledek byl ověřen sekvenací. Náš výsledek 8,2 % PCR pozitivních zvířat z celkového souboru 330 psů je vyšší než dosud publikované záchyty *A. phagocytophilum* u psů v České republice. V pracích Kybicové et al. (2009) se uvádí 3,4 % a Spejchalové et al.<sup>16</sup> 1,7 % pozitivních zvířat.

V naší práci jsme se dále zaměřili na skupinu PCR pozitivních zvířat. U těchto psů byla v době odběru jednoznačně prokázána přítomnost DNA *A. phagocytophilum* v krvi. U 13 (48,2 %) těchto PCR pozitivních psů byly zaznamenány klinické příznaky popisované u ana-

plasmózy. Infekce se nejčastěji projevovala nechutněním (44,4 %), apatií (40,7 %) a horečkou (25,9 %). Šest psů (22,2 %) mělo neurologické potíže (záchvaty, parézy nebo plegie) a jeden (3,7 %) měl potíže gastrointestinální (zvracení, průjem). Šest psů (22,2 %) nejevilo žádné klinické příznaky onemocnění. U osmi psů (29,6 %) byla stanovena diagnóza nesouvisející s infekcí anaplasmami. Ve třech případech byla anaplasmóza prokázána u zvířat, u kterých se dá předpokládat imuno-deficit – 2x nádorové onemocnění a 1x selhání ledvin. U třech dalších psů vykazujících apatií a horečku byla prokázána splenomegalie a lymfadenopatie.<sup>4,6,11</sup> Trombocytopenie byla zjištěna v osmi případech (36,4 %), u pěti psů zároveň s výskytem horečky. Hodnoty trombocytů se pohybovaly od  $26.10^9/l$  do  $134.10^9/l$ . S výjimkou psa s histiocytárním sarkolem a babesiozou byla trombocytopenie zjištěna jen u psů, kteří vykazovali klinické příznaky související s anaplasmózou. Počty leukocytů nevykazovaly u našich pacientů výrazné změny. Pokud byly hodnoty snížené (13,6 %), pohybovaly se spíše těsně pod dolní hranicí fyziologického rozmezí. Leukopenii jsme zaznamenali jen u psů s klinickými příznaky popisovanými u anaplasmózy. Se stejnou frekvencí jsme zaznamenali i leukocytózu (13,6 %). To je rozdíl oproti často popisované leukopenii a lymfopenii v článkích od jiných autorů.<sup>4,5,14,15,16</sup> Na druhou stranu je některými autory uváděn počet leukocytů také ve fyziologickém rozmezí.<sup>10</sup> Mazepa et al.<sup>12</sup> popisují leukocytózu u 28 % vyšetřených zvířat. Kybicová et al.<sup>9</sup> ve své studii uvádí leukocytózu také jako jeden ze stěžejních nálezů vedle trombocytopenie a anémie. Melter et al.<sup>13</sup> při popisu prvního zdokumentovaného případu anaplasmózy v naší republice také nezaznamenali změny v celkovém počtu bílých krvinek. Z těchto údajů je zřejmé, že leukopenii nebo leukocytózu nelze považovat za nález typický pro infekci anaplasmami. Mírnou anémii jsme zjistili u 18,1 % zvířat. To je v souladu se zjištěním řady autorů popisujících hematologické nálezy v případech infekce anaplasmami.<sup>4,9,12,14</sup> U 12 psů (54,5 %) byly zvýšeny aktivity jaterních enzymů. Sledovali jsme hodnoty ALT, AST a ALP, přičemž se jednalo o zvýšení jednoho, dvou nebo všech tří enzymů. Nelze však jasně odlišit, zda bylo toto zvýšení zapříčiněno anaplasmózou. Zvýšené aktivity jaterních enzymů jsou také často popisované řadou autorů.<sup>9,12,14,16</sup> Egenvall et al.<sup>4</sup> u experimentálně infikovaných beaglů zvýšení jaterních enzymů nezaznamenali.



Obr. 4 – PCR vyšetření – *A. phagocytophilum*

**Tab. 6 – Průběh anaplasmózy u psa plemene Chesapeake Bay retrívra**

Datum vyšetření	8. 6. 10	9. 6. 10	11. 6. 10	14. 6. 10	21.06.10	28. 6. 10	7. 7. 10
Tělesná teplota	40,8	37,7	38,0	38,8	38,1	–	–
Počet trombocytů	191	63	121	270	385	333	322
Počet leukocytů	10,8	6,2	6,5	9,4	13,1	10,2	11,9
Počet erytrocytů	5,99	5,79	6,15	5,83	5,87	6,53	6,86
Moruly v neutrofilech	+	+	+	–	–	–	–
PCR	+	+	+	–	–	–	–
Titr protilátek	neg	neg	neg	neg	2 560	2 560	2 560
Léčba doxycyclinem	–	+	+	+	+	+	+

Pokud shrneme naše nálezy a porovnáme je s nálezy jiných autorů, lze konstatovat, že nejvýraznější a nejčastěji zastoupenou abnormalitou v hematologickém a biochemickém vyšetření krve je trombocytopenie. Někteří autoři uvádí právě trombocytopenii u více než 90 % psů s anaplasmózou.<sup>6,14</sup> Ke snížení počtu trombocytů dochází zároveň s objevením se klinických příznaků, zejména horečky, apatie a nechutenství. K úpravě celkového počtu trombocytů dochází většinou během jednoho týdne. Dokumentuje to i námi popsaný případ anaplasmózy u Chesapeake Bay retrívra, u kterého byla trombocytopenie zjištěna pouze po dobu čtyř dnů.

Ostatní abnormality (počty leukocytů, erytrocytů a hodnoty aktivity jaterních enzymů) jsou vyjádřené méně často a trvají jen krátce. Změny jsou vždy nejvýraznější v akutní fázi onemocnění, která je doprovázena klinickými příznaky.

Sérologické vyšetření těchto PCR pozitivních psů bylo negativní u 12 vyšetřených zvířat (46,2 %). Tento výsledek ukazuje na časný záchyt infekce, kdy ještě nedošlo k tvorbě IgG specifických protilátek. U 14 sérologicky pozitivních psů byly naměřeny titry protilátek od 160 do 10 240. Protilátky se začínají objevovat za 8 - 10 dní po infekci a v akutní fázi titry rychle dosahují hodnot 640 až 2560 a za tři týdny až 10 240 či 20 480.<sup>1,4,6,9,10,16</sup>

Vyšetření ukázalo, že nejvyšší počet PCR pozitivních zvířat byl ve věkové kategorii do pěti let (15 jedinců – 55,6 %), nejnižší mezi 5 – 10 lety (pět jedinců – 18,5 %) a mírný vzestup následoval po 10. roku života (sedm jedinců – 25,9 %). To odráží obecný názor, že k infekcím jsou obvykle náchylnější zvířata mladších věkových kategorií a pak zase zvířata starší. Dosud nebyl v publikovaných studiích zjištěn statisticky významný rozdíl ve výskytu anaplasmózy v závislosti na věku a pohlaví.

Mezi PCR pozitivními psy jednoznačně převažovali jedinci samčího pohlaví – 20 psů (74 %) a sedm fen (26 %). Kirtz et al.<sup>8</sup> a Kybicová et al.<sup>9</sup> popisují převahu jedinců samčího pohlaví v rámci souborů séropozitivních zvířat. Nejvyšší počet PCR pozitivních zvířat byl prokázán v měsíci květnu (16 případů) a březnu (4 případy), což činí celkem 74 % všech pozitivních záchytů. Pokud bychom započítali pozitivní záchyty v období od měsíce března do měsíce června, tedy období, které se váže na zvýšenou jarní aktivitu klíšťat, získáme celkem 23 zvířat s prokázanou DNA *A. phagocytophilum*, což činí 85,2 % ze všech pozitivních záchytů. Po jednom záchytu pak bylo v měsících lednu, únoru, červenci a září. Tento údaj

koreluje se zjištěním Kybicové et al.<sup>9</sup> V jejich práci bylo osm z deseti PCR pozitivních psů (80 %) detekováno v období od dubna do července, jeden záchyt byl v srpnu a jeden v září.

V případě ročního psa plemene Chesapeake Bay retrívra jsme zachytily typický průběh klinické anaplasmózy. V den předvedení psa na kliniku byla zjištěna horečka 40,8 °C, apatie a nechutenství, doprovázené trombocytopenií a nálezem morul v neutrofilech. Počet těchto inkluzí v neutrofilech dosáhl až 15 %. U psů se popisuje nejčastěji počet postižených neutrofilů kolem 5 až 37 %.<sup>4,13,15</sup> Nejnižší počet trombocytů byl 2. den – 63.10<sup>9</sup>/l. Někteří autoři popisují pokles počtu trombocytů až na hodnoty 29.10<sup>9</sup>/l,<sup>13</sup> hodnoty v rozmezí 60–90.10<sup>9</sup>/l, resp. hodnoty nižší než 150.10<sup>9</sup>/l.<sup>4,5,10,15</sup> Přítomnost infekce byla potvrzena PCR vyšetřením. Trombocytopenie, moruly a pozitivní PCR byly zachyceny jen první čtyři dny po objevení se klinických příznaků. Mezi 4. a 7. dnem došlo k vymizení morul a počet trombocytů se upravil do fyziologických hodnot. Počet leukocytů a erytrocytů se v akutní fázi mírně snížil, ale k poklesu pod fyziologické hodnoty nedošlo. Sérologické vyšetření bylo do 7. dne negativní, mezi 7. až 13. dnem došlo k detekci specifických protilátek. Titr dosáhl 13. den hodnot 2560 a přetrval minimálně měsíc od počátku onemocnění. Po 43 dnech byl naměřen mírný pokles titru protilátek na 1280. Akceptovaným kritériem pro právě probíhající infekci je průkaz čtyřnásobného nárůstu titru protilátek,<sup>7</sup> k čemuž v prezentovaném případě došlo. K sérokonverzi dochází přibližně za 2–5 dní po objevení se morul v periferní krvi.<sup>4</sup> To odpovídá nástupu tvorby protilátek i v případě našeho pacienta. Od 2. dne onemocnění byl zvířeti podáván doxycyclin. Efekt terapie v podobě vymizení klinických příznaků se dostavuje již za 12–24 hodin.<sup>14</sup> U našeho pacienta došlo během 24 hodin k ústupu klinických příznaků. Terapie doxycyclinem trvala čtyři týdny a byla úspěšná.

Porovnali jsme pozitivní výsledky PCR vyšetření mezi našimi dvěma základními skupinami psů s klinickými příznaky onemocnění a bez nich, jejichž celkový počet činil 330. U zdravých psů jsme DNA *A. phagocytophilum* prokázali v 8,7 % a u psů s různými klinickými příznaky onemocnění v 8 % případů. Rozdíl v záchytu DNA *A. phagocytophilum* mezi těmito dvěma skupinami nebyl statisticky významný. To znamená, že se často dostávaly do kontaktu s patogenem a že infekce v našich podmínkách probíhá často asymptomaticky.

Pokud shrneme výše prezentované výsledky vyšetření, můžeme konstatovat, že tyto nálezy jsou v souladu s pracemi jiných autorů, kteří popisují průběh anaplasmózy u psů v Evropě. Na našem kontinentu probíhá tato infekce spíše asymptomatically nebo jen s mírnými klinickými příznaky a prezentuje se nejčastěji jako akutní febrilní syndrom.<sup>3,14</sup> Z našich výsledků je zřejmé, že námi vyšetření psi, kteří pocházelí především z Brna, jeho okolí a Jihomoravského kraje, se často dostávají do styku s *A. phagocytophilum*. Nejvýznamnějším laboratorním nálezem je pak nález trombocytopenie. PCR vyšetření se ukázalo jako vhodné pro diagnostiku anaplasmózy. Naproti tomu sérologické vyšetření není pro stanovení akutně probíhající infekce dostatečné. Pokud nezjistíme nárůst titru protilátek v párovém vzorku odebraném za 2–4 týdny, nelze z negativního výsledku či z nízkého titru protilátek dělat diagnostické závěry. Jen velmi vysoké titry protilátek (10 240 a více) mohou indikovat nedávný kontakt s patogenem.

## Závěr

Veterinární lékaři by měli vždy zvažovat možnost anaplasmózy u zvířat projevujících příznaky apatie, nechutenství a horečky spojené s nálezem trombocytopenie. Riziko je vyšší zvláště v jarních měsících (od března do června). V anamnéze může, ale také nemusí být údaj o infestaci klíšťaty zhruba 1–2 týdny před objevením se klinických příznaků onemocnění. Řada majitelů, zvláště u zvířat s delší srstí, nemusí přítomnost klíšťat nebo jejich vývojových stadií vůbec zaznamenat. Diagnóza anaplasmózy je tak postavena na čtyřech bodech. Zvíře musí vykazovat klinické příznaky, musí zde být možnost kontaktu s vektorem, musí odpovídat laboratorní nálezy a diagnózu potvrzuje i odpověď na terapii.

### Literatura:

- Bakken, J. S., Halley, I., Riddell, D., Walls, J. J., Dumler, J. S. The serological response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 2002;34:22-27.
- Blanco, J. R., Oteo, J. A. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Mikrob Inf* 2002; 8:763-772.
- Dumlej, J. S., Madigan, J. E., Pusterla, N., Bakken, J. S. Ehrlichioses in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 2007;45:45-51.
- Egenvall, A., Björsdorff, A., Lilliehöök, I., Engvall, E. O., Karlstrom, E., Artursson, K., Hedhammar, Å., Gunnarsson A. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *Vet Rec* 1998;143:412-417.
- Egenvall, A. E., Hedhammar, Å. A., Björsdorff, A. I. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec* 1997;140:222-226.
- Graig, B., Asanovich, K. M., Armstrong, P. J., Dumler, J. S. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;34:44-48.
- Harrus, S., Wagner, T., Björsdorff, A., Shaw, S. Ehrlichiosis and anaplasmosis. In: *Arthropod-borne Infectious disease of the dog and cat* (Shaw S.E., Day M.J., Eds.) London; Manson Publishing Ltd., 2005:120-133.
- Kirtz, G., Czettel, B., Thum, D., Leidinger, E. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Austria: a serological prevalence study (2001-2006). *Klientierpraxis*. 2007;52:562-568.
- Kybícová, K., Schánilec, P., Hulinská, D., Uherková, L., Kurzová, Z., Spejchalová, S. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008;9:655-661.
- Lilliehöök, I., Egenvall, A., Tvedten, H. W. Hematopathology in dogs experimentally infected with a swedish granulocytic *Ehrlichia* species. *Veterinary Clinical Pathology* 1998;27:116-122.
- Little, S. E. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2010;40:1121-1140.
- Mazepa A. W., Kidd L. B., Zouny K. M., Trepanier L. A. Clinical presentation of 26 *Anaplasma phagocytophilum*-seropositive dogs residing in an endemic area. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2010;46:405-412.
- Melter, O., Stehlík, I., Kinská, H., Volfová, I., Tichá, V., Hulinská, D. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a young dog: case report. *Veterinární Medicina*. 2007;52: 207-212.
- Poitout, F. M., Shinozaki, J. K., Stockwell, P. J., Holland, C. J., Shukla, S. K. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in western Washington State. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:796-801.
- Pusterla, N., Hudér, J., Wolfensberger, C., Litschi, B., Paris, A., Lutz, H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997;35: 2307-2309.
- Spejchalová, S., Kybícová, K., Kurzová, Z., Uherková, L., Schánilec, P., Borská, P., Svobodová, Z. Anaplasmosa u psů v České republice. *Veterinářství* 2008;2:89-96.
- Walls J. J., Caturegli P., Bakken J. S., Asanovich K. M., Dumler J. S. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using *epank1* genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group *Ehrlichiae*. *J Clin Microbiol* 2000;38:354-356.

### Adresa autora:

**MVDr. Jarmila Konvalinová, Ph.D.,**  
**Klinika chorob psů a koček**  
**FVL VFU Brno**  
**Palackého tř. 1/3,**  
**612 42 Brno**