

# Obraz krwi w przebiegu anaplazmozy granulocytarnej u psów i koni

Janina Łukaszewska<sup>1,2</sup>, Łukasz Adaszek<sup>3</sup>, Stanisław Winiarczyk<sup>3</sup>

z Katedry Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu<sup>1</sup>,  
Przychodni dla Zwierząt we Wrocławiu<sup>2</sup> oraz Katedry Epizootologii i Kliniki Chorób  
Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie<sup>3</sup>

Anaplazmoza granulocytarna jest zakaźną wielonarządową chorobą ludzi i zwierząt, przebiegającą z trombocytopenią. Czynnikiem etiologicznym choroby są drobnoustroje zaliczane wcześniej

do rodziny Rickettsiaceae, rodzaju *Ehrlichia*. Obecnie klasyfikuje się je w rzędzie Rickettsiales w obrębie rodziny Anaplasmataceae (1, 2, 3). Badanie sekwencji genu 16S rRNA pozwoliło na zaliczenie

do taksonu *Anaplasma phagocytophilum* trzech patogenów uważanych do niedawna za oddzielne gatunki, a będących czynnikami etiologicznymi erlichiozy/anaplazmozy psów (*Ehrlichia phagocytophila*), koni (*Ehrlichia equi*) oraz ludzi (HGE agent – human granulocytic ehrlichiosis agent; 3)

Choroba występuje na całym świecie, a obecność tych drobnoustrojów najczęściej stwierdza się u koni i psów, rzadziej zaś u bydła, owiec, kóz, kotów, lisów, lam, jeleni i ludzi (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13). W Polsce w ostatnim czasie coraz częściej notuje się przypadki anaplazmozy granulocytarnej wśród zwierząt. Monitoring serologiczny prowadzony m. in. wśród psów,

## Hematological changes in granulocytic anaplasmosis in dogs and horses

Łukaszewska J.<sup>1</sup>, Adaszek Ł.<sup>2</sup>, Winiarczyk S.<sup>2</sup>, Department of Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences<sup>1</sup>, Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin<sup>2</sup>

*Anaplasma phagocytophilum* is an intracellular bacteria with tropism for hematopoietic cells. Anaplasmosis is a tick-borne disease which occurs in animals and in humans. In Europe it is transmitted by blood-sucking *Ixodes ricinus*. Wild and domestic animals can be reservoir of this microorganism. Clinically anaplasmosis is characterized by fever, apathy and mucosal bleeding but these symptoms are not specific. Hematological examination may reveal thrombocytopenia. In this article specific hematological features of granulocytic anaplasmosis were described.

**Keywords:** *Anaplasma phagocytophilum*, thrombocytopenia, horse, dog.

bydła i świń wskazuje na kontakt rodzimych zwierząt z riketsjami, co pośrednio świadczy o występowaniu drobnoustrojów *Anaplasma* na terenie naszego kraju (14, 15, 16). Definitywnym potwierdzeniem ich obecności było wykazanie materiału genetycznego riketsji w organizmach kleszczy pochodzących z różnych rejonów Polski (17, 18).

Do zakażenia zwierząt dochodzi poprzez ukąszenie przez kleszcze *Ixodes* spp. (9), które są wektorami riketsji. Objawy kliniczne anaplazmozy są nieswoiste. Początkowo występuje apatia, osłabienie i wysoka gorączka. W ostrej anaplazmozie dochodzi do spadku masy ciała, krwawienia z błon śluzowych oraz powiększenia wątroby, śledziony i węzłów chłonnych. Mogą pojawiać się także wymioty, biegunka, zapalenia stawów, arytmia, tachykardia oraz

objawy nerwowe w postaci drgawek i porażań (20). Badaniami hematologicznymi stwierdza się trombocytopenię oraz niedokrwistość, która może rozwinąć się w postaci nieregeneratywnej, jako wynik hipoplazji szpiku kostnego lub choroby przewlekłej (20, 21, 22, 23, 24).

Na obszarach endemicznego występowania choroby jej podejrzenie stawia się na podstawie objawów klinicznych oraz danych z wywiadu. Pełne rozpoznanie opiera się na wynikach badań laboratoryjnych: hematologicznych, testach serologicznych oraz reakcji PCR, przy czym ta ostatnia jest testem z wyboru stosowanym w diagnostyce zarówno anaplazmoz, jak i erlichioz ludzi i zwierząt (25, 26). Mikroskopowa ocena rozmazów krwi barwionych metodą Giemsy lub Diff-Quick (27) dostarcza niezwykle cennych informacji, dotyczących nie tylko obecności drobnoustrojów w krwinkach białych lecz także stopnia upośledzenia funkcji układu krwiotwórczego. Pozwala to odpowiednio ukierunkować terapię zakażonego zwierzęcia, tak aby jej skutki były jak najbardziej zadowalające. W artykule pragniemy przedstawić zmiany hematologiczne obserwowane we krwi zwierząt zakażonych riketsjami *Anaplasma phagocytophilum*.

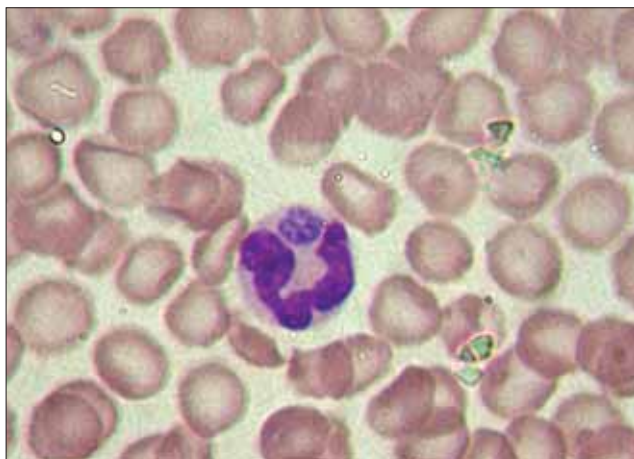
Obserwacje własne przeprowadzono na 12 psach i 5 koniach, u których zakażenie *Anaplasma* diagnozowano na podstawie badania mikroskopowego rozmazów krwi oraz wykazania materiału genetycznego tych drobnoustrojów w pełnej krwi techniką PCR wykonaną według Adaszka (15). Amplifikacji odcinka genu 16S RNA dokonywano przy użyciu starterów EHR521 i EHR747 ograniczających odcinek DNA o długości 247par zasad. Uzyskane produkty PCR sekwencjonowano, a następnie porównywano z sekwencjami DNA *Anaplasma phagocytophilum* zamieszczonymi w banku genów GenBank. Badaniem mikroskopowym morule riketsji wykazano w 9 próbkach krwi pobranej od psów i 4 pobranych od koni. Testem PCR

materiał genetyczny drobnoustrojów wykazano we wszystkich 17 badanych przypadkach. Sekwencje izolatów własnych wykazywały największy stopień podobieństwa (97,6–99,9%) z sekwencją 16S RNA *Anaplasma phagocytophilum* o numerze EU 090186 zamieszczoną w banku genów.

Jedną z najczęściej wykazywanych w przebiegu anaplazmozy zmian w obrazie krwi była trombocytopenia, opisywana zarówno u ludzi, koni, psów, jak i innych gatunków zwierząt (28, 29, 30, 31, 32). Klinicznym objawem zmniejszenia liczby płytek krwi jest występowanie wybroczyn na błonach śluzowych.

Mechanizm powodujący trombocytopenię nie jest do końca wytłumaczony przyjmuje się, iż jego powodem może być immunologiczne niszczenie płytek krwi, zwiększona ich fagocytoza przez makrofagi, hipoplazja szpiku oraz nasilony rozpad płytek krwi w śledzionie. Niekiedy w powstawaniu trombocytopenii zaangażowane są jednocześnie wszystkie wymienione mechanizmy (31, 32). Stosunkowo często w badaniu morfologicznym krwi pobranej od chorych osobników stwierdzano także leukopenię. Oprócz trombocytopenii jest ona często wymieniana jako jeden z głównych objawów anaplazmozy/erlichiozy u zwierząt (30, 32, 33). Niektórzy autorzy stwierdzali jednak różną liczbę leukocytów, np. u psów z tą chorobą (28). Z obserwacji własnych wynika, że leukopenii na ogół towarzyszy nieznaczna neutropenia i znaczna limfopenia, które razem z eozynopenią są charakterystyczne dla leukogramu stresowego. W przypadkach anaplazmozy neutropenia może pojawić się przy przewlekłym przebiegu choroby (30, 33). Wywołana jest prawdopodobnie czynnikami immunologicznymi, hipoplazją lub dysplazją szpiku kostnego. Jako jej przyczynę wymienia się również wzrost liczby plazmacytów w szpiku kostnym, co obserwowano np. u psów (32, 34, 35).

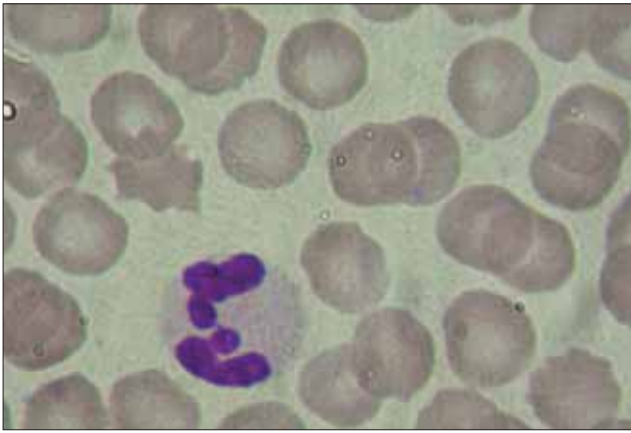
Mimo że zakażeniu riketsjami może towarzyszyć zarówno limfocytoza, jak



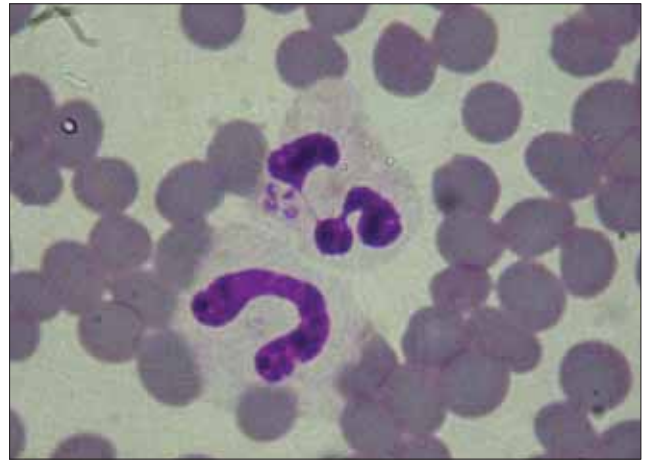
Ryc. 1. Ciało wtrętowe składające się z ciałek podstawowych; morula w neutrofilu psa



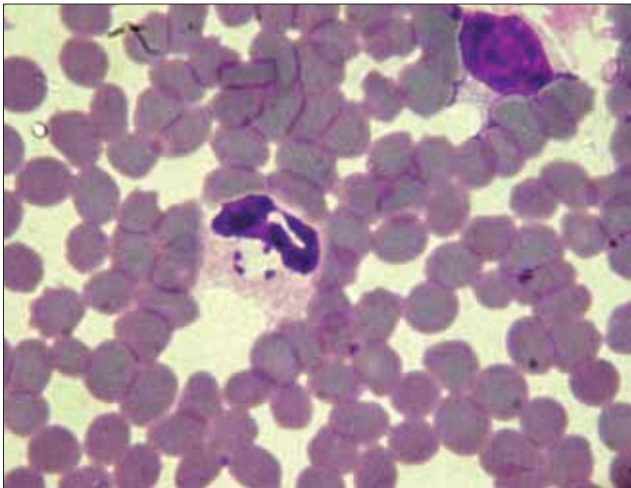
Ryc. 2. Obecność dwóch moruli w neutrofilu konia



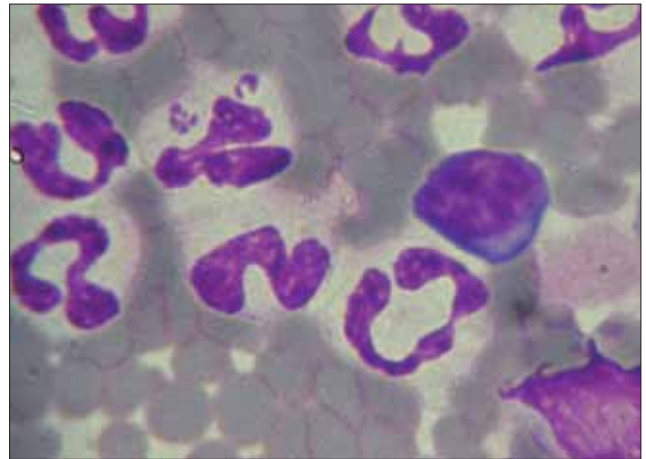
Ryc. 3. Neutrofil segmentowany – jeden z segmentów może przypominać riketsję *Anaplasma phagocytophilum*



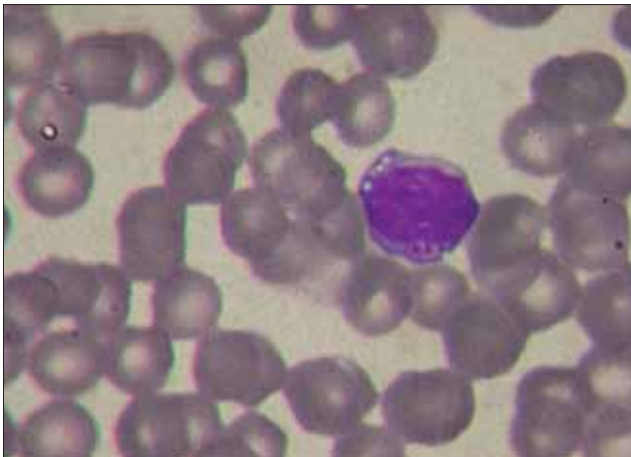
Ryc. 4. Rozpadająca się na ciała podstawowe morula w neutrofilu konia



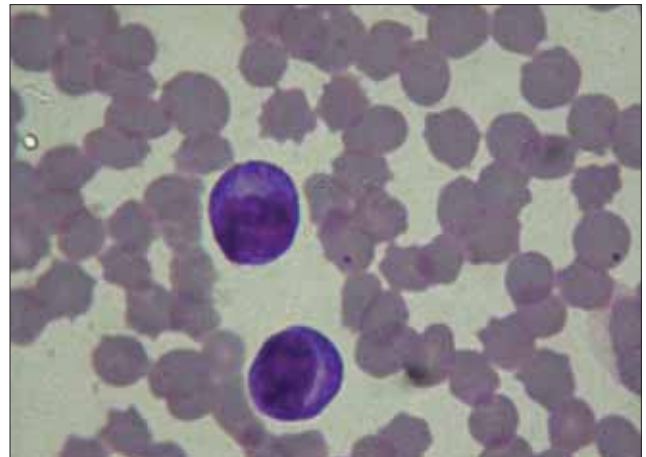
Ryc. 5. Wodniczka z resztkami moruli w neutrofilu konia



Ryc. 6. Charakterystyczny obraz krwi obwodowej w anaplazmzie u koni. Widoczne dwie morule w neutrofilu oraz plazmocyty



Ryc. 7. Limfocyt ziarnisty u psa – częste zjawisko w przebiegu erlichiozy

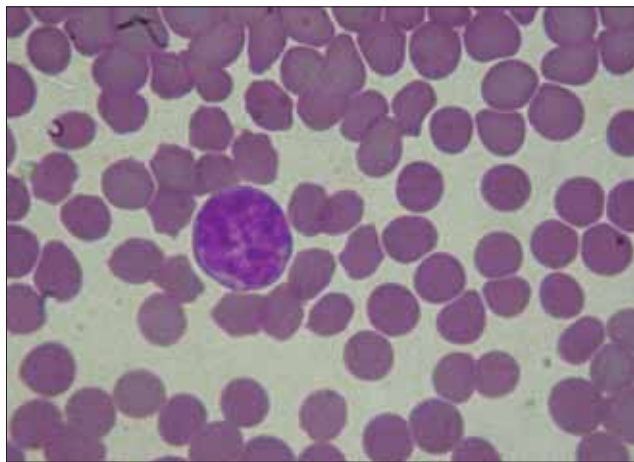


Ryc. 8. Plazmocyty we krwi konia zakażonego *Anaplasma phagocytophilum*

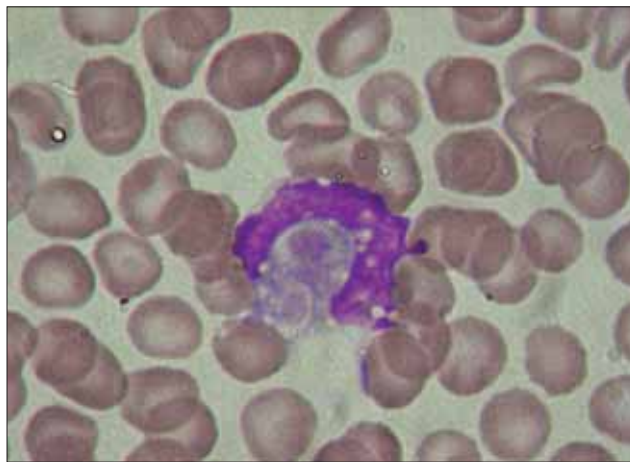
i limfopenia (20, 29, 32), z obserwacji własnych wynika, iż częściej u zakażonych zwierząt stwierdzana jest znacznego stopnia limfopenia. W żadnym z opisywanych przypadków anaplazmozy nie stwierdzono limfocytozy. Wśród limfocytów wykazywano charakterystyczne dla tej choroby komórki odczynowe (do 50%) – plazmocyty oraz limfocyty odczynowe z pofałdowanym jądrem i ciemnoniebieską cytoplazmą, często z ziarnistościami.

Opisano nawet limfocytozę sugerującą białaczkę limfocytarną z powodu obecności dużych, ziarnistych limfocytów. Obserwacje te są zgodne z danymi literatury światowej, świadczy to o pobudzeniu immunologicznym, towarzyszącemu anaplazmzie granulocytarnej (29, 31, 32, 33). Plazmocytarne nacieki mogą występować w szpiku kostnym, nerkach, oponach mózgowych, siatkówce i wątrobie (31).

U 50% badanych zwierząt (zarówno koni, jak i psów) stwierdzano niedokrwistość o charakterze nieregeneratywnym, którą często notuje się jako wynik hipoplazji szpiku kostnego lub choroby przewlekłej (20, 23, 24, 32). Niektóre psy z niedokrwistością wykazują dodatni wynik bezpośredniego testu Coombsa, co świadczy o pojawianiu się niedokrwistości typu immunologicznego (31). Przy ciężkim przebiegu przewlekłej postaci choroby obserwuje



Ryc. 9. Limfocyt odczynowy z pofalowanym jądrem u konia z anaplazmozą



Ryc. 10. Monocyt fagocytujący płytki krwi u psa, jedna z przyczyn trombocytopenii w przebiegu anaplazmozy

się pancytopenię wskutek hipoplazji szpiku kostnego, pojawia się megatrombocytopenia, a we krwi obwodowej widoczne są nieliczne, duże płytki krwi (31).

Dotychczas, w diagnozowanych przez autorów przypadkach anaplazmozy granulocytarnej u koni i psów, ciała wtrętowe riketsji – morule stwierdzano jedynie w neutrofilach. Odsetek zakażonych komórek wynosił 3–8. Wtręty złożone były z licznych, delikatnych (pręcikowatych, okrągłych lub owalnych) ciałek początkowych, wielkości 0,18–1,4 µm, koloru od ciemnoniebieskiego do purpurowego, umieszczonych w wodniczkach otoczonych błoną. W niektórych neutrofilach ulegały one rozpadowi na ciała podstawowe, a ich resztki znajdowały się w wodniczkach. W podobny sposób struktury te zarówno u zwierząt, jak i u ludzi opisywane są w literaturze światowej (24, 27, 28). Pojawiają się one po 48 godzinach od zakażenia i np. po 3–5 dniach znajdują się u zakażonych koni nawet w 30–40% neutrofilii. Podanie glikokortykosteroidów zwiększa ich liczbę (36). W jednym z leczonych przez nas przypadków anaplazmozy granulocytarnej u konia, podanie zwierzęciu deksametazonu spowodowało wzrost liczby zakażonych neutrofilii z 4 do 10%.

Dotychczas autorom tej pracy nie udało się wykazać riketsji w eozynofilach, mimo że u koni i psów w przebiegu choroby mogą się one pojawiać w tych komórkach (8, 24, 27). Stwierdzano natomiast, zwłaszcza u koni, eozynopenię opisywaną także u psów (32).

Niekiedy w przebiegu anaplazmozy notuje się martwicę komórek wątrobowych. Dochodzi wówczas do podwyższenia aktywności enzymów wątrobowych we krwi i zaburzeń ze strony układu pokarmowego. W następstwie odwodnienia podwyższeniu ulega poziom mocznika w surowicy krwi (21, 31, 38), a w moczu często pojawia się białko (22, 31). Czasami dochodzi do niewydolności nerek będącej następstwem

ich kłębuszkowego zapalenia oraz do hipalbuminemii. Częściej jednak stwierdza się hiperproteinemię, wynikającą z hiper gammaglobulinemii (21, 31, 37). U koni zakażonych riketsjami obserwuje się także zwiększenie w osoczu poziomu białka ostrej fazy – fibrynogenu (23).

Jak więc widać, wpływ zakażenia drobnoustrojami *Anaplasma phagocytophilum* na kształtowanie się wskaźników hematologicznych ogranicza się nie tylko do rozwoju trombocytopenii, jakkolwiek jest to objaw najbardziej charakterystyczny i pojawiający się najwcześniej, lecz także dochodzić może do zmian ilościowych i jakościowych w zasadzie we wszystkich rodzajach komórek krwi. Wykazanie w badaniu mikroskopowym, np. plazmocytoz czy też limfocytów odczynowych u zwierząt, które miały kontakt z kleszczami i wykazują objawy kliniczne, może nasuwać podejrzenie anaplazmozy, nawet przy braku stwierdzenia ciałek wtrętowych w leukocytach, ale dopiero obecność tych ostatnich jest na tyle charakterystyczna, że uprawnia do podjęcia stosownej terapii. Należy pamiętać, iż podobny obraz przedstawia zakażenie *Babesia canis* u psów (38, 39).

## Piśmiennictwo

- Dumler J. S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G. H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R.: 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.
- Dumler J.S., Asanovich K.M., Bakken J.S., Richter P., Kimsey R., Madigan J.E.: Serologic cross-reactions among Ehrlichia equi, Ehrlichia phagocytophila and human granulocytic Ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* 1995, **33**, 1098–1103.
- Rymaszewska A.: Pozycja systematyczna Anaplasma phagocytophilum. W: Skotarczak B.: *Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze*. PZWL, Warszawa 2006.
- Barlough J. E., Madigan J. E., Turoff D. R., Clover, J. R. Shelly, S. M., Dumler J. S.: An Ehrlichia strain from a llama (Lama glama) and llama-associated ticks (Ixodes pacificus). *J. Clin. Microbiol.* 1997, **35**, 1005–1007.
- Bjöersdorff A., Bagert B., Massung R.F., Gusa A., Eliasson L.: Isolation and characterization of two European strains of Ehrlichia phagocytophila of equine origin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, **9**, 341–343.
- Tarello W.: Microscopic and clinical evidence for Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum infection in Italian cats. *Vet. Rec.* 2005, **156**, 772–774.
- Pusterla N., Chang C. C., Chomel B. B., Chae J. S., Foley J. E., DeRock E., Kramer H., Lutz V.L., Madigan J.E.: Serologic and molecular evidence of Ehrlichia sp. in coyotes in California. *J. Wildl. Dis.* 2000, **36**, 494–499.
- Pusterla N., Huder J., Feige K., Lutz H.: Identification of granulocytic Ehrlichia strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other rickettsiae. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 2035–2037.
- Pusterla N., Huder J.B., Leutenegger M.C., Braun U., Madigan J.E., Lutz H.: Quantitative real-time PCR for detection of members of the Ehrlichia phagocytophila group in host animals and Ixodes ricinus ticks. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 1329–1331.
- Weber R., Pusterla N., Loy M., Leutenegger C. M., Schar G., Baumann D., Wolfensberger, C., Lutz H.: Serologic and clinical evidence for endemic occurrences of human granulocytic ehrlichiosis in north-eastern Switzerland. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 2000, **130**, 1462–1470.
- Lotric-Furlan S., Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Nicholson W.L., Sumner J.W., Childs J.E., Strle F.: Clinical and serological follow-up of patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, **8**, 899–903.
- Madigan J.E., Pusterla N.: Ehrlichial diseases. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2000, **16**, 487–499.
- Adaszek L., Winiarczyk S.: Erlichioza psów. *Życie Wet.* 2007, **82**, 991–993.
- Adaszek L.: Wybrane aspekty epidemiologii babeszjozy, borelioz i erlichiozy u psów. Rozprawa doktorska, Lublin 2007.
- Winiarczyk S., Adaszek L., Štefančíková A., Pet'ko B., Cislakova L., Puchalski A.: Serological investigations for borreliosis and ehrlichiosis in pig and cattle populations in the Lublin voivodeship. *Medycyna Wet.* 2007, **63**, 561–565.
- Zygnier W., Jaros S., Wedrychowicz H.: Prevalence of Babesia canis, Borrelia afzelii, and Anaplasma phagocytophilum infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet. Parasitol.* 2008, **153**, 139–142.
- Cisak E., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J., Wójcik-Fatała A., Polak J., Dutkiewicz J.: Risk of tick-borne bacterial diseases among workers of Roztocze National Park (south-western Poland). *Ann. Agric. Environ. Med.* 2005, **12**, 127–132.
- Inokuma H., Raoult D., Brouqui P.: Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog tick (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa island. *Japan. J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 4219–4221.
- Reubel G., Kimsey R., Barlough J., Madigan J.: Experimental transmission of Ehrlichia equi to horses through naturally infected ticks (Ixodes pacificus) from northern California. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 2131–2134.
- Goodman R., Hawkins E., Olby N., Grindem C., Hegarty B., Breitschwerdt E.: Molecular identification of Ehrlichia

- ewingii infection in dogs: 15 cases (1997–2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003, **222**, 1102–1107.
22. Leipidi H., Bunnell J., Martin M., Stuen S., Dumler S.: Comparison pathology and immunohistology associated with clinical illness after Ehrlichia phagocytophila – group infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000, **62**, 29–37.
  23. Madigan J., Barlough J., Dumler J., Schankman S., DeRock E.: Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* 1996, **34**, 434–435.
  24. Madigan J., Gribble D.: Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968–1981). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987, **15**, 445–448.
  25. Amusatęgui I., Sainz A., Tesouro M.A.: Serological evaluation of Anaplasma phagocytophilum infection in livestock in northwestern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, **1078**, 487–490.
  26. Alberti A., Sparagano O.A.: Molecular diagnosis of granulocytic anaplasmosis and infectious cyclic thrombocytopenia by PCR-RFLP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, **1081**, 371–378.
  27. Sells D.M., Hildebrandt P.K., Lewis G.E., Nyindo M.B., Ristic M.: Ultrastructural observations on Ehrlichia equi organisms in equine granulocytes. *Infect. Immun.* 1976, **13**, 273.
  28. Ettinger S.J., Feldman E.C.: *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat*. W.B. Saunders Co., 5<sup>th</sup> ed., Philadelphia 2000; vol.1. s. 402–406.
  29. Scorpio D.G., Leutenegger C., Berger J., Barat N., Madigan J.E., Dumler J.S.: Sequential analysis of Anaplasma phagocytophilum msp2 transcription in murine and equine models of human granulocytic anaplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008, **15**, 418–424.
  30. Kim H –Y., Mott J., Zhi N., Tajima T., Rikihisa Y.: Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in horses experimentally infected with Anaplasma phagocytophila. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, **9**, 1079–1084.
  31. Kuehn N., Gaunt S.: Clinical and hematological findings in canine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1985, **186**, 355–358.
  32. Leipidi H., Bunnell J., Martin M., Stuen S., Dumler S.: Comparison pathology and immunohistology associated with clinical illness after Ehrlichia phagocytophila –group infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000, **62**, 29–37.
  33. Hamilton K., Standaert S., Kinney M.: Characteristic peripheral blood findings in human ehrlichiosis. *Mod. Pathol.* 2004, **17**, 512–517.
  34. Brown M., Rogers K.: Neutropenia in dogs and cats: a retrospective study of 261 cases. *J. Am. Hosp. Assoc.* 2001, **37**, 131–139.
  35. Day M. Immune-mediated cytopenias. WSAVA Congress 2004; Rhodes – Greece.
  36. Egenwall A., Lilliehook I., Bjoersdorff A.: Detection of Ehrlichia species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet Rec.* 2000, **146**, 186–190.
  37. Łukaszewska J., Gulko J., Stefaniak T.: Dlaczego babeszjoza psów czasami leczy się ciężko. *Magazyn Wet.* 200, **9**, 34–36.
  38. Sainz A. Clinical and therapeutic aspects of canine ehrlichiosis. 27 WSAVA Congress, 2002.
  39. Adaszek Ł., Winiarczyk S.: Babeszjoza psów – wciąż aktualny problem. *Wiadomości Parazytol.* 2008, **54**, 109–115.

---

Dr Janina Łukaszewska, ul. C.K. Norwida 5/27, 50-375 Wrocław, e-mail: janina.lukaszewska@neostrada.pl