

**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ**

**ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА - СКОПЈЕ**



**Елена М. Атанаскова Петров**

**КЛИНИЧКИ И ДИЈАГНОСТИЧКИ ПРИСТАП КАЈ  
КУЧЕШКАТА МОНОЦИТНА ЕРЛИХИОЗА ВО  
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА**

**-Докторска дисертација-**

**Скопје, 2018 година**

# **КЛИНИЧКИ И ДИЈАГНОСТИЧКИ ПРИСТАП КАЈ КУЧЕШКАТА МОНОЦИТНА ЕРЛИХИОЗА ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА**

Клучни зборови: кучешка моноцитна ерлихиоза, куче, клинички симптоми, qPCR,  
ELISA, брзи дијагностички тестови

## **CLINICAL AND DIAGNOSTIC APPROACH OF CANINE MONOCYTTIC EHRLICHIOSIS IN REPUBLIC OF MACEDONIA**

Key words- canine monocytic ehrlichiosis, dog, clinical signs, qPCR, ELISA, Snap tests

Лабораториските анализи од истражувањето беа целосно изработени на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, во Лабораторијата за хематологија и биохемија, како и во Лабораторијата за серологија и молекуларна дијагностика.

**Ментор:** проф. д-р Тони Довенски

**Датум на одбрана:**12.07.2018

**Комисија за одбрана:**

Проф. д-р Јована Стефановска

Проф. д-р Вања Крстиќ

Проф. д-р Димитар Кузмановски

Проф. д-р Дине Митров

Проф. д-р Игор Улчар

*Посветено на моето семејство*

## СОДРЖИНА

ЛИСТА НА КРАТЕНИЦИ.....	1
ИЗВАДОК.....	3
АВСТРАСТ .....	5
1. ВОВЕД.....	7
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА.....	9
2.1. Историјат и таксономија на <i>Ehrlichia canis</i> .....	9
2.2. Епизоотиологија и епидемиологија.....	11
2.3. Патогенеза.....	13
2.4. Клиничка манифестација.....	17
2.5. Промени на хематолошките и биохемиските параметри.....	19
2.6. Протеини на акутна фаза - Ц-реактивен протеин.....	22
2.7. Дијагностицирање на заболувањето моноцитна ерлихиоза.....	24
2.7.1. Преглед на крвен размаз.....	25
2.7.2. Серолошки дијагностички методи.....	26
2.7.3. Молекуларна дијагностика.....	28
2.8. Терапија на МЕК.....	30
2.9. Прогноза.....	33
2.10. Превентива.....	33
2.11. Опасност за здравјето на луѓето.....	34
3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕ.....	36
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	37
4.1. Животни и дизајн на студијата.....	37
4.2. Клиничка и лабораториска дијагностика на МЕК.....	38
4.2.1. Подготовка и земање примероци за анализа.....	38
4.2.2. Хематолошка и биохемиска анализа.....	38
4.2.3. Ц-реактивен протеин (CRP).....	39
4.3. Методи за серолошка дијагностика на антитела за <i>E. canis</i> .....	39
4.3.1. Одредување на антитела за <i>E. canis</i> со комерцијални брзи дијагностички тестови.....	39
4.3.2. Одредување на антитела за <i>E. canis</i> со ELISA-метод....	40
4.3.3. Испитување на присуството на антитела на <i>L. infantum</i> со методот IFAT.....	42
4.4. Молекуларна дијагностика на МЕК.....	43

4.4.1. Примероци за анализа.....	43
4.4.2. Прочистување на DNA од примероците од полна крв.....	44
4.4.3. Детекција на DNA од <i>E. canis</i> со qPCR.....	44
4.5. Терапевтски протокол за МЕК.....	46
4.6. Статистичка анализа на податоците.....	47
4.6.1. Клинички симптоми.....	47
4.6.2. Хематолошки и биохемиски параметри.....	47
4.6.3. Споредби на резултатите од серолошки анализи и qPCR.....	47
4.6.4. Застапеност на болеста.....	48
5. РЕЗУЛТАТИ.....	49
5.1. Клиничка манифестација на болеста.....	49
5.2. Хематолошки параметри.....	51
5.3. Биохемиски параметри на серумот.....	54
5.4. Застапеност на болеста според превентива, старост и пол на кучињата.....	57
5.5. Резултати од серолошките испитувања.....	57
5.6. Молекуларна анализа и компарација на молекуларните и серолошките испитувања.....	60
5.7. Терапевтски протокол и ефикасност на терапијата.....	63
5.8. Коинфекција со <i>Leishmania infantum</i> .....	63
6. ДИСКУСИЈА.....	64
6.1. Клиничка манифестација на МЕК.....	65
6.2. Промени на хематолошките параметри кај МЕК.....	66
6.3. Промени на биохемиските параметри на серумот кај МЕК.....	69
6.4. Серолошка дијагностика.....	72
6.5. Молекуларна дијагностика.....	73
6.6. Терапија.....	76
6.7. Коинфекција со лишманија.....	79
7. ЗАКЛУЧОЦИ.....	81
8. ПРИЛОГ.....	83
9. БЛАГОДАРНОСТ.....	94
10. ЛИТЕРАТУРА.....	95

## ЛИСТА НА КРАТЕНИЦИ

КРАТЕНИЦА	ЗНАЧЕЊЕ
E. canis	Ehrlichia canis
ELISA	Анализа со ензимска детекција на антитела
IFAT	Имунофлуоресцентен тест за антитела
PCR	полимераза верижна реакција
qPCR	квантитативна полимераза верижна реакција
МЕК	моноцитна ерлихиоза кај кучиња
rRNA	рибозомска рибонуклеинска киселина
<i>R. sanguineus</i>	Ripicerphalus sangvineus
IFN- $\gamma$	интерферон-гама
IL-1 $\beta$	Интерлеукин-1 бета
IL-8	Интерлеукин-8
АТА	антитромбоцитни антитела
MPV	среден волумен на тромбоцитите
ALT	аланин аминотрансфераза
ALKP	алкална фосфатаза
CRP	Ц-реактивен протеин
AAG	алфа кисел гликопротеин
kD	килодалтони
IgG	имуноглобулин Г
WB	Вестерн блотинг
IgM	имуноглобулин М
DNK	дезоксирибонуклеинска киселина
tRNK	транспортна рибонуклеинска киселина
iRNK	информациска рибонуклеинска киселина
aPTT	време на активација на тромбопластин
WBC	бели крвни клетки
EDTA	етилендиаминтетраоцетна киселина
AST	аспартат аминотрансфераза
TIA	имунотурбидиметрија
°C	степен Целзиусов
ОГ	Оптичка густина
ИП	индекс на позитивност
PBS	пуфер
tepsl	температура-епистакса-слабост
tslbl	температура-слабост-бледи лигавици
tljko	покачена температура, зголемени лимфни јазли и промени на кожа
MCV	среден корпускуларен волумен
MCHC	средна концентрација на хемоглобин во корпускулите
RBC	црвени крвни клетки
HCT	хематокрит
Hgb	хемоглобин
PLT	тромбоцити

ALB	албумин
GLOB	глобулин
a	адулт
g	геријатрија
M	машко
F	женско
$\chi^2$	хи-квадрат
SE	стандардна грешка
R2	коефициент на корелација
ЦНС	централен нервен систем
TP	вкупни протеини
SAA	серум амилоид А
Hp	хаптоглобин
MCH	средна концентрација на хемоглобин во еритроцитите
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>

## ИЗВАДОК

Заболувањето моноцитна ерлихиоза кај кучињата (МЕК) е предизвикано од грам-негативната облигаторна интрацелуларна и високо плеоморфна бактерија *Ehrlichia canis*. Главниот вектор за пренесување на болеста е кафениот крлеж *Rhipicephalus sanguineus*. Инфекцијата со *E. canis* кај кучињата може да помине асимптоматски со месеци или брзо да се развијат сериозни клинички симптоми. Се работи за мултисистемско заболување кое се манифестира во акутна, супклиничка или хронична форма. Присуството на ова заболување во земјите соседни на Република Македонија, како и голем број случаи во секојдневната клиничка практика нè поттикнаа да го започнеме ова истражување, со особен акцент на клиничките карактеристики, лабораториската дијагностика, спроведување на терапевтскиот протокол и следење на неговата успешност.

Во ова истражување беше опфатена хетерогена популација од вкупно 124 (84 болни и 40 здрави) кучиња. Кучињата беа од различна раса, пол и возраст, од територијата на Град Скопје. Детална анамнеза, комплетен клинички преглед, крвна слика, биохемиска анализа на серумот, Ц-реактивен протеин, серолошки и молекуларни тестирања беа направени кај кучињата сомнителни за моноцитна ерлихиоза. Од серолошките тестови се користеа брзите дијагностички тестови и индиректна ELISA, додека за детекција на ДНК од *Ehrlichia canis* беше користен qPCR. Дополнително, сите болни кучиња беа тестирани за присуството на антитела за *Leishmania infantum* со методот на IFAT, поради можноста за коинфекција со оваа протозоа. Кај сите болни кучиња беше спроведен терапевтски протокол со доксициклин (10 mg/kg/24 h - 28 дена) и кај еден дел од нив (43) е направена контрола по завршување на терапијата. За статистичка анализа на податоците беа користени повеќе тестови: клиничката манифестација на болеста со дескриптивна статистика и Fisher exact test, анализата на хематолошките и биохемиските резултати беше направена со помош на Shapiro-Wilk - тест за дистрибуција на податоците, Mann-Whitney U Test и/или Студентов Т-тест, Wilcoxon Matched Pairs Test и Т-тест на зависни примероци, а серолошките тестови беа споредувани со „Анализа на совпаѓање“ (Agreement analysis) и Cohen's Kappa Statistics, 2x2 Contingency tables и Пирсонов хи-квадрат тест на независни варијабли.

Како најчест клинички симптом во групата болни кучиња беше покачената телесна температура (87,84 %), анорексија (77,03 %), апатија/слабост (74,32 %) и бледи лигавици (56,76 %). Генерално гледано, тромбоцитопенијата беше присутна кај 95,24 %,

намален број на еритроцити кај 75 %. Статистички значителна разлика ( $p < 0,01$ ) помеѓу болни и здрави животни беше забележана во однос на албумини и вкупни протеини, како и алкална фосфатаза. Анализите на резултатите добиени за Ц-реактивниот протеин не покажаа статистичка значителност. Серолошки позитивни беа прогласени примероците кои дадоа позитивен резултат на еден тест, сите 84 болни кучиња беа позитивни барем на еден од тестовите. Сите болни кучиња беа тестирани за присуство на *L. infantum* и 28,6 % покажаа позитивен резултат. Молекуларната дијагностика покажа дека од сите болни кучиња, позитивни на DNK за *E. canis* беа 45 %. При споредбата на резултатите од секој серолошки тест со qPCR се доби заклучок дека ниту еден од серолошките тестови не е усогласен со qPCR. Комплетното повлекување на клиничките симптоми, подобрување на хематолошките и биохемиските резултати, како и негативен резултат на qPCR беа потврда за успешност на терапевтскиот протокол.

## ABSTRACT

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is a disease due to infection with a Gram negative obligatory intracellular highly pleomorphic bacteria *Ehrlichia canis*. Main vector for transmission of this bacteria is the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. The infection with *E. canis* in dogs can be asymptomatic in months or with immediate development of clinical signs. The disease is multisystem, and can manifest as acute, subclinical or chronic form. Presence of this disease in the Macedonia's neighbor countries, as well as the amount of clinical cases in the country, inspired us to begin with this research, with accent on the clinical manifestation, laboratory diagnosis, treatment protocol and its efficiency.

This research includes heterogeneous population of 124 (84 ill and 40 healthy) dogs. The dogs originate from the territory of Skopje and from different breed, gender and age. Detail anamnesis, complete clinical examination, blood count, serum biochemistry, C reactive protein, serology and molecular analysis, were performed for all dogs that were suspicious for CME. Snap test were used as well as indirect ELISA for detection of antibodies against *Ehrlichia canis* and qPCR for detection of *Ehrlichia canis* DNA. Additionally all ill dogs were tested for *Leishmania infantum* antibodies with the IFAT method, due to a possibility of co-infection. Therapeutic protocol with doxycycline (10 mg/kg/24h 28 days) was introduced in all clinically ill dogs, and in some of them (n= 43) control after treatment was performed.

Statistical analyses were made with several tests, such as descriptive statistic and Fisher exact test for the clinical manifestation, Shapiro-Wilk test, Mann-Whitney U Test and Student T test, Wilcoxon Matched Pairs Test and T test of depended subjects were used for the hematology and biochemistry results, while for the serological test results Agreement analysis, Cohen's Kappa Statistics, 2x2 Contingency tables and Pearson's chi-squared test were used.

The most often clinical sign in the group of ill dogs was high temperature (87.84 %,) anorexia (77.03 %), apathy/weakness (74.32 %) and pale mucous membrane (56.76 %). In general, thrombocytopenia was 95.24% prevalent, decreased level of the red blood cells in 75 %. Statistical difference ( $p < 0.01$ ) between ill and healthy dogs was noted in the values for the albumins, total proteins and alkaline phosphatase. The results for the C reactive protein did not show any statistical difference. The samples were pronounced as serological positive if they gave positive result on at least one serological test, all of the 84 ill dogs were positive. The group of the clinically ill dogs were also tested for antibodies against *L. infantum* and 28.6 % were positive. The results from the molecular diagnosis showed that 45% of the seropositive dogs had DNA of *E. canis*. None of the serological tests was consistent with the qPCR.

Complete recovery of the clinical signs, improvement of the hematology and biochemistry results, as well as negative qPCR result were used as confirmation of the treatment efficiency.

## 1. ВОВЕД

Моноцитната ерлихиоза припаѓа во групата на вектор-преносливи болести, предизвикана од бактерија од родот *Ehrlichia*, *E. canis*. Вектор за пренесување на болеста е кафениот крлеж, *Rhipicephalus sanguineus*, чиј развоен циклус се одвива преку формите ларва, нимфа и возрасен крлеж. Болеста се пренесува преку сите форми на развој на крлежот; односно крлежите во фаза на ларва или нимфа се заразуваат со каснување на заболено куче и може да ја пренесат болеста во следната развојна фаза - нимфа или адулт. Крлежот останува заразен долго време, при што болеста ја пренесува преку плунката што ја лачи при хранењето. Заболувањето исто така може да се пренесе и преку трансфузија на крв. Преваленцијата на болеста зависи од климатските услови погодни за раст и развој на векторите, а заболувањето е забележано на територијата на соседните земји.

Заболувањето моноцитна ерлихиоза кај кучињата може да се манифестира во акутна, супклиничка и хронична форма на заболување. Периодот на инкубација на бактеријата изнесува од 8 до 20 дена, за кое време се мултиплицира во макрофагите на моноцитно-фагоцитниот систем, преку кој се распространува низ организмот на инфицираното куче. Акутната форма на болеста се манифестира со потешка клиничка слика, покачена температура, депресија и анорексија, а од лабораториските резултати се јавува маркантна тромбоцитопенија. Акутната фаза може да трае 20 - 30 дена. Супклиничката форма се карактеризира без клиничка манифестација на болест, може да трае од месеци до години. Кучињата во супклиничка форма се носители на заболувањето. Хроничната ерлихиоза е најтешката форма на болеста која може да биде опасна за животот на кучето, со рекурентни клинички и хематолошки промени кои вбројуваат: панцитопенија, хеморагии, моноцитоза, лимфоцитоза и слабеење.

Дијагностиката на моноцитната ерлихиоза е комплексна и се поставува преку различни методи, со различен степен на сензитивност и специфичност за детекција на *Ehrlichia canis*. Серолошки методи кои најчесто се користат за докажување на специфични антитела за *E.canis* се брзи дијагностички тестови, ELISA, индиректна имунофлуоресценца (IFAT). Серолошките методи се ефикасни во детектирањето на антитела за *E. canis*, но недостаток е неможноста за диференцирање на моменталната или изминатата инфекција, со што се ограничува нивната употреба според потврдата на болеста. Молекуларната детекција со *Polymerase Chain Reaction (PCR)* се користи за откривање и идентификација на индивидуите заразени со ерлихиа. Квантитативен real-

time PCR (qPCR) е повеќе сензитивен метод од конвенционалниот PCR и овозможува квантификација на присутните бактерии во примероците од полна крв, слезена или коскена срцевина.

Тетрациклините се антибиотици кои најчесто се употребуваат во терапијата на бројни бактериски заболувања кои ги пренесуваат крлежите, вклучувајќи ги и оние предизвикани од рикеции. Како најупотребуван антибиотик од оваа група за терапија на МЕК е *доксциклинот*, со различен степен на успешност.

Сè уште не постои комерцијално достапна ефикасна вакцина против *E. canis*, така што контролата на крлежите останува најефективната превентивна мерка.

## 2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

### 2.1. Историјат и таксономија на *Ehrlichia canis*

Заболувањето моноцитна ерлихиоза е предизвикано од бактеријата *Ehrlichia canis*. За првпат ова заболување е опишано кај куче од страна на *Donatien u Letosquard* (1) во Алжир, Африка. За време на Виетнамската војна, моноцитната ерлихиоза била опишана како заболување кое предизвикало масовно угинување на работните кучиња од расата германски овчар. Денес пак е широко распространето заболување, особено во тропските и суптропските области, а како природни домаќини на *E. canis* се наведени припадниците на фамилијата *Canidae* (2).

*E. canis* е грам-негативна облигаторна интрацелуларна, високо плеоморфна, мала кокусна бактерија со брановидна тенка мембрана. Оваа бактерија е помала во однос на другите од родот *Ehrlichias*. Содржи единечен циркуларен хромозом кој е составен од 1 315 030 нуклеотиди (3). Таа е примарниот причинител на моноцитната ерлихиоза кај кучињата (МЕК), додека природни резервоари на *E. canis* се дивите и домашните каниди.

Кралство - Bacteria

Колено – Proteobacteria

Класа – Alpha proteobacteria

Ред - Rickettsiales

Фамилија – Anaplasmataceae

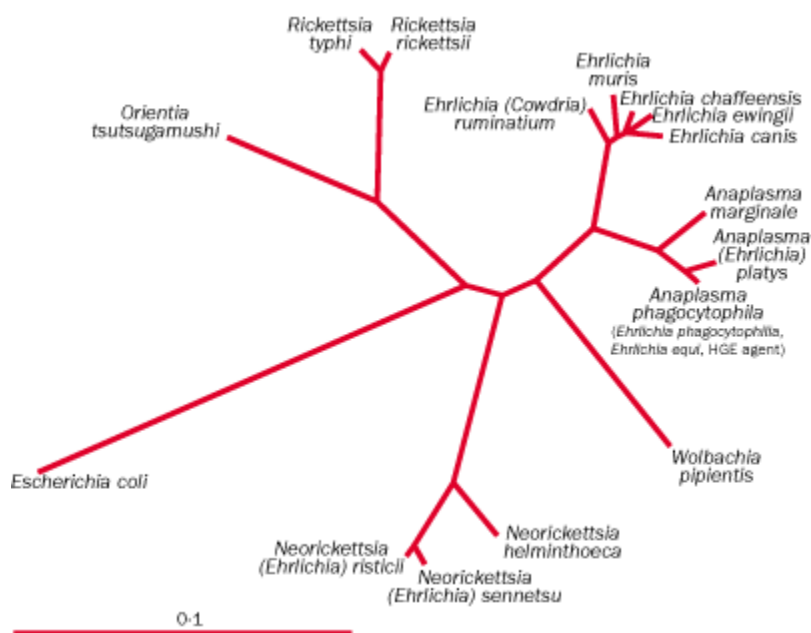
Род - Ehrlichia

Вид - Ehrlichia canis

Врз основа на филогенетска анализа на генски секвенци (молекуларна анализа на две геномски регии -16S rRNK и groESL), направена е класификација на родот *Ehrlichia* (4). Во редот *Rickettsiales* припаѓаат две фамилии: фамилија *Rickettsiaceae* со родовите *Rickettsia* и *Orientia* и фамилијата *Anaplasmataceae* со родовите *Ehrlichia*, *Anaplasma* и *Neorickettsia* (5). Претставниците од родот *Ehrlichia* и *Anaplasma* се пренесуваат со крлеж, тие се интрацелуларни, грам-негативни бактерии, додека претставниците од родот *Neorickettsia* не се пренесуваат со крлежи.

Денес врз основа на генетската анализа на 16S rRNK, *heat-shock* протеините и протеините на површината на клетката, направена е рекласификација на родот *Ehrlichia*

кој моментално ги содржи следните видови: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* и *E. ruminantium* (слика 1) (6, 7).



Слика1. Филодендограм кој ја демонстрира еволуциската поврзаност на *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia*, *Neorickettsia*, *Orientia*, и *Rickettsia* родовите врз основа на 16S rRNA генска секвенца (8)

Пред повеќе од 20 години се сметало дека инфекцијата со бактериите од типот ерлихија се домаќин-специфични. Во поново време изолирана е бактерија генетски и антигенски слична на *E. canis* од човек во Венецуела (9), за што постојат и докази дека бактерии од групата *E. phagocytophila* предизвикуваат заболување кај кучиња, мачки, коњи и луѓе (10). *E. chaffeensis* која првично е изолирана и карактеризирана како предизвикувач на заболување кај луѓето, исто така е изолирана и кај кучињата кај кои предизвикува сериозно заболување (11).

Табела 1. Приказ на заболувањата предизвикани од *Ehrlichia* и слични патогени

Вид	Најчесто име на болеста/и	Најчест природен домаќин/и	Најчесто инфицирани клетки	Примарен вектор/и	Распространетост
<i>E. canis</i>	Моноцитна ерлихиоза кај кучиња (МЕК)	Кучиња и други членови на фамилијата Canidae, мачки, луѓе?	Примарно мононуклеарните клетки (моноцити и лимфоцити)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>	Насекаде, примарно тропски, суптропски и топли краеве

<i>E. chaffeensis</i>	Хумана моноцитна ерлихиоза (ХМЕ)	Луѓе, елени, коњи, глодари	Моноцити, макрофаги	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i>	САД, Европа, Африка, Јужна и Централна Америка, Кореа
<i>E. ewingii</i>	Кучешка гранулоцитна ерлихиоза, (КГЕ), хумана гранулоцитна ерлихиоза (ХГЕ)	Кучиња, луѓе	Примарно неутрофили и еозинофили	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Otobius megnini</i>	САД, Африка, Кореа
<i>E. muris</i>	Не е јасно поврзана со некоја болест	Глодари, луѓе	Мононуклеарни клетки	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Јапонија
<i>E. ruminantium</i>	Heartwater disease	Преживари	Ендотелни клетки	<i>Amblyomma</i> spp.	Африка, Кариби

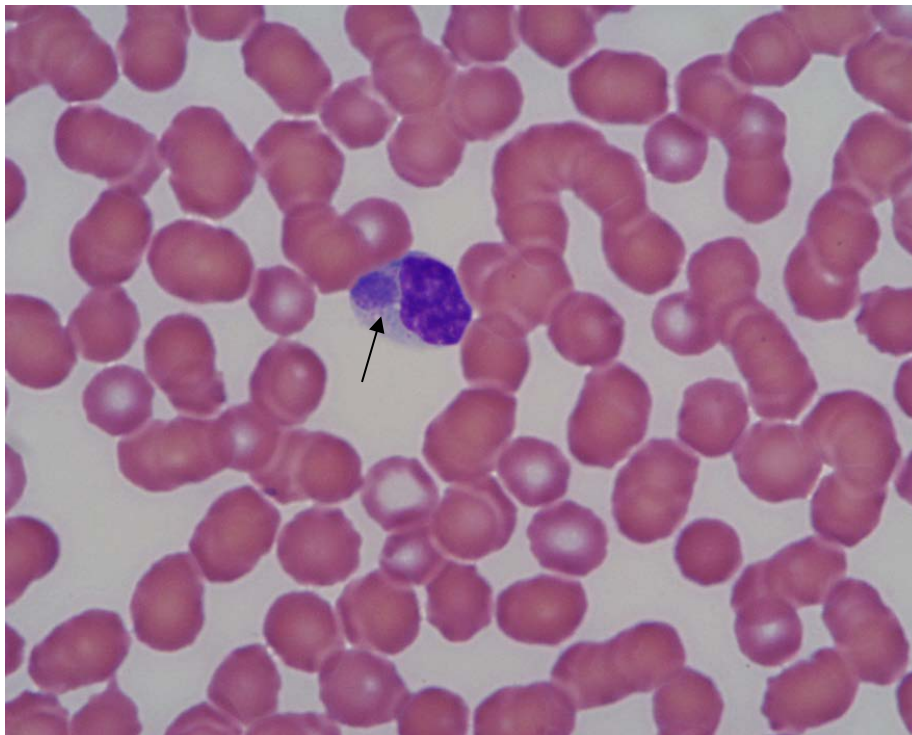
## 2.2. Епизоотиологија и епидемиологија

Болеста МЕК, генерално се пренесува преку каснување од заразен крлеж. Распространетоста на *E. canis* може да се определи според застапеноста на векторот и домаќинот кој е резервоар на болеста. Покрај *E. canis* која се пренесува со крлежот *Rhipicephalus sanguineus*, останатите бактерии од истата фамилија се: *E. ruminantium* која се пренесува со крлежи од родот *Amblyomma*, *E. chaffeensis* и *E. ewingii* кои се пренесуваат со крлежи од родот *A. americanum* и *Dermacentor variabilis* и *E. muris* која се пренесува со крлежи од родот *Haemaphysalis flava* и *Ixodes persulcatus* (12,13, 14). Векторот на *Ehrlichia canis*, *R. sanguineus* е широко распространет во пределите со тропска, суптропска или медитеранска клима (Централна и Јужна Америка, источна и западна Азија, Африка, Кина, Австралија и Јужна Европа) (15, 16).

*E. canis* има комплексен животен циклус во кој се вклучени вектор (крлеж) и домаќин (цицач). Главниот вектор за пренесување на болеста е кафениот крлеж *Rhipicephalus sanguineus* кој припаѓа во фамилијата *Ixodidae*. Развојниот циклус на крлежот се одвива преку 3 форми: ларва, нимфа и адултна форма. Бактеријата се пренесува преку сите фази на развој на крлежот; односно крлежите во фаза на ларва или нимфа се заразуваат со каснување на заболено куче и ја пренесуваат болеста во следната

фаза - нимфа или адулт. Заразениот крлеж останува инфективен долго време (околу 155 дена), при што болеста ја пренесува преку плунката што ја лачи при хранењето. Заболувањето исто така може да се пренесе и преку трансфузија на крв (16, 17) .

Бактеријата *E. canis* формира микроколони во форма на интрацелуларни вакуоли (морула) сместени примарно до мембраната, во моноцитите и макрофагите на домаќинот. Се реплицира само во цитоплазмата на моноцитите и формирањето на интрацелуларната вакуола – морула (слика 2) е специфична карактеристика која може да се користи во понатамошната дијагностика (18).



Слика 2. Морула на *E. canis* во цитоплазмата на моноцит (Sainz и сор. (18))

Уште во 1935 година, Donatien и Lestoquard (1) укажале на трансстадумски и трансоваријален пренос на *E. canis* во *R. sanguineus*. Нешто подоцна, Groves и сор. (19) наведуваат дека *R. sanguineus* е вистинскиот вектор за *E. canis* и дека пренесувањето се случува трансстадиумски, но не и трансоваријално, па според нив векторот не може да биде резервоар на болеста. Кај кучињата, хронична инфекција може да перзистира дури до 5 години, па затоа хронично инфицираните кучиња и дивите каниди како што се лисици, волци и којоти се еден вид природни резервоари на *E. canis*. Експериментално е докажано дека е можен пренос на заболувањето од лисици на кучиња преку *R. sanguineus* (19, 20).

Сè поголема е зачестеноста на вектор-преносливите болести во Европа. Човековиот фактор како и климатските промени, особено глобалното затоплување, влијаат врз распространетоста на артроподите, како вектори на ова заболување. Во последниве 10 години моноцитната ерлихиоза е проширена и на територијата на јужна Европа, каде што ова заболување се смета за ензоотско. Поради географската раширеност на *R. sanguineus* низ територијата на континентална Европа, забележано е проширување на болеста кон северните земји, на пример во Франција и Белгија. За првпат, болеста е забележана во Холандија во 2008 година (16). Во последниве години ова заболување е забележано на територијата на Грција, Бугарија, Албанија и Србија (21, 22, 23, 24). Ова заболување, иако е присутно во нашата земја, релативно е недоволно истражено (25).

Филогенетската анализа направена врз основа на секундарната структура на 16S rRNA укажува на тоа дека генот кај повеќето соеви на *E. canis* е високо запазен/конзервиран. Секвенците на 16S rRNA генот носат 99,4 – 100 % сличност помеѓу соевите од Северна Америка (OklahomaT, Florida and Jake), Јужна Америка (VDE, VHE, Brazil-CO1 и Brazil-CO2), Европа (Madrid, GR21 и GR78), Среден Исток (Turkey и 611), Јужна Африка (Germishuys) и Азија (Czh982, Gdt3, Gxht67, Bangkok и Kagoshima 1) (26).

### 2.3. Патогенеза

Заразувањето со бактеријата *E. canis* се случува при гризнување на инфициран крлеж, *Rhipicephalus sanguineus*, кој пак може да ја пренесува болеста минимум уште 155 дена од инфицирањето. Поради долгиот период на инфективноста на крлежот, можно е тој да ги преживее зимските месеци и напролет да зарази кучиња. Заради тоа, може да се смета дека крлежот е воедно резервоар за пренесување на болеста од една до друга година (27).

Местото на кожата гризнато од крлежот и секрецијата од неговите плунковни жлезди ги привлекува мононуклеарните клетки, што придонесува во процесот на инфицирање на моноцитите со *E. canis*. Во инфицираниот крлеж, *E. canis* се размножува во хематоцитите и клетките на плунковната жлезда, навлегува во дигестивниот тракт и потоа го инфицира епителот на цревата. Само родот *Canidae* е приемчив на инфекции со *E. canis*. Кучињата може да бидат инфицирани без клинички знаци повеќе од 5 години, поради што дивите и домашните каниди се сметаат за природен резервоар на *E. canis* (15).

По влегувањето во организмот, *E. canis* навлегува во моноцитите и макрофагите на домаќинот. Оваа бактерија има ткивен тропизам за моноцитно-макрофагните клетки на слезената, црниот дроб и лимфните јазли. Во своите истражувања Gaunt и сор. (28) и Vanethet и сор. (17), докажале дека заболувањето моноцитна ерлихиоза е дозно зависно, односно при мала инфекција со *E. canis*, одбранбениот механизам на домаќинот се ослободува од инфекцијата, па според нив само високи дози од бактеријата предизвикуваат заболување (17, 28).

Во клеточниот ѕид на оваа бактерија недостасуваат пептидогликан и липополисахариди, кои вообичаено се присутни во мали количини кај другите грам-негативни бактерии. Се смета дека токму овој недостаток придонесува во отпорноста на оваа бактерија кон имунолошкиот одговор на домаќинот. Недостатокот на овие две материи ја намалува ригидноста на клеточниот ѕид, што овозможува надворешниот дел од клеточниот ѕид да биде динамичен и да ги избегне антителата на домаќинот (3).

Фазите во процесот на инвазија на *E. canis* во клетките на домаќинот вклучуваат:

- адхезија, ендоцитоза и интрацелуларна пролиферација, проследена со
- егзоцитоза и интерцелуларно ширење.

Неколку протеини на надворешната мембрана на *E. canis*, вклучувајќи ги гликопротеин (gp) 19, gp36 и gp140, учесници се во процесите на адхезија и ендоцитоза во клетката домаќин (29).

*E. canis* е способна да го модулира вродениот имун одговор преку протеинот gp200. Овој протеин се транслоцира во јадрото на инфицираните моноцити и има потенцијал да ја помага интрацелуларната активација на комуникациските патишта на домаќинот, што резултира со нарушена антимицробна заштита. Имуноиндуцираната хемолитичка анемија предизвикана од *E. canis* и присуството на антиромбоцитни антитела кои се врзуваат со тромбоцитите и циркулирачките имуни комплекси укажуваат на вклученоста на механизмите на имуниот одговор во патогенезата на болеста (30).

За разлика од акутната форма, многу помалку се знае за патогенезата на хроничната форма на ерлихиозата. Некои клинички испитувања укажуваат дека германските овчари се поприемчиви на *E. canis* инфекција со многу поголем морбидитет и морталитет наспроти останатите раси. Усложнувањето на клиничката состојба на болеста ја зголемуваат коинфекциите со други вектор-преносливи болести (*Leishmania infantum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Hepatozoon canis*, *Anaplasma* spp., или други *Ehrlichia* spp.), како и различната вирулентност на соевите на *E. canis* (31).

Последните истражувања укажуваат дека тежината на клиничката слика кај МЕК може да биде поврзана со видот на имунолошкиот одговор (Th1 vs Th2) и профилот на цитокините кои се поттикнати од инокулацијата. Високи концентрации на IFN- $\gamma$  се забележани кај лесна форма на болеста, додека перзистентно покачени IL-1 $\beta$  и IL-8 се пронајдени кај кучиња со потешка клиничка манифестација на болеста (32, 33). Иако клеточниот имунитет е основен при заштитата од *E. canis*, богатиот хуморален одговор не дава заштита, напротив, истиот може да биде штетен за домаќинот. Плазмоцитозата на коскената срцевина е значително почеста кај миелосупресивната од немилосупресивната ерлихиоза. Сè уште недоволно е истражена можноста дека деструкцијата на матичните клетки од коскената срцевина е со имунолошка патогенеза. Постојана реинфекција со *E. canis* ги зголемува шансите за потешка форма на заболувањето (31).

Постојат голем број докази дека имунолошките механизми се вклучени во патогенезата на акутната МЕК. Тие вклучуваат обемна инфилтрација на плазмоцити во паренхиматозните грани, присуството на поликлонска хипергамаглобулинемија која не е во корелација со специфичен титар на антитела за *E. canis*, позитивен *Coomb's* и автоаглутинациски тестови, индукција на производство на АТА (антитромбоцитни антитела) при експериментална инфекција на кучиња со *E. canis* (34). Не постои предиспонираност во однос на возраста или полот на кучињата, така што можат да заболат сите раси на кучиња, иако германските овчари се поприемчиви од останатите раси (35). Разликата во расната предиспозиција може да се објасни со разликите во можноста да се покрене соодветен клеточен и/или хуморален имунолошки одговор. Во прилог на ова е истражувањето на Nyindo и сор. (36), каде што клеточниот имунолошки одговор, но не и хуморалниот, на германските овчари за *E. canis* е намален во однос на кучиња од раса бигл. Ова истражување укажува на тоа дека клеточниот имунолошки одговор е поважна компонента на имуниот систем, како заштита против *E. canis*. Иако хуморалниот одговор нема важна улога во заштитата против *E. canis*, се смета дека придонесува во патогенезата на болеста (37).

Иако се смета дека механизмите на имунолошкиот одговор придонесуваат за намалувањето на бројот на неутрофилите и леукоцитите за време на акутната фаза на МЕК, сепак сè уште не постои конкретен доказ кој ја поддржува оваа теорија. Имунолошките механизми може да имаат улога и во деструкцијата на еритроцитите (38).

Дополнително, направено е истражување во однос на улогата на слезената во патогенезата на МЕК. Клиничките и хематолошките наоди укажале дека текот на

болеста е значително полесен кај кучиња без слезена, но не е утврдена разлика во времето на појавување или титарот на антитела за *E. canis*. Слезената има клучна улога во патогенезата на МЕК што е уште еден доказ дека имунолошките механизми се вклучени во патогенезата на болеста (39).

Опишани се патохистолошки промени на повеќе органи кои настануваат како последица на инфекцијата со *E. canis*, меѓу кои кај црниот дроб, слезената, лимфните јазли, очите итн., што ја објаснува и разновидноста на клиничката манифестација на болеста. При инфекција со *E. canis* настанува слабо до умерено покачување на активноста на црnodробните ензими (аланин аминотрансфераза и алкална фосфатаза) (40). Патохистолошки, забележана е инфилтрација на лимфоцити, плазмоцити и макрофаги околу порталните крвни садови, што предизвикува видливо изобличување на перипорталната хистолошка структура, централобуларна масна дегенерација и лесна до умерена периваскуларна инфилтрација на мононуклеарни клетки (41). Спленомегалијата е истакнат патолошки наод кај акутна и хронична фаза од болеста (42). Во акутната фаза, спленомегалијата е неконгестивна и е предзвикана од дифузна пролиферација на лимфоцити и плазмоцити во белата и црвената пулпа. Слезената е главниот резервоар на ерлихија, токму поради изобилството на макрофаги во овој орган. Според некои истражувања, ова е последен орган кој ја содржи бактеријата пред нејзината елиминација (43). Лимфаденомегалија е чест клинички наод за време на акутната фаза од болеста (40). Зголемувањето на лимфните јазли е дел од хиперпластичната активност на В- и Т-лимфоцитите, како одговор на стимулацијата од ерлихијата (44). Патохистолошки забележана е променета градба на лимфопоетичното ткиво со плазмоцитоза и генерализирана периваскуларна акумулација на лимфоидни клетки и плазмоцити. Цитоморфолошките промени се позастапени кај кучињата во хронична фаза од болеста (45). Во почетната фаза на болеста коскената срцевина е хиперпластична, што одговара со изобилството на плазмоцити. Исто така се зголемува бројот на мегакариоцитите во коскената срцевина за време на акутната фаза, како реакција на периферната тромбоцитопенија, што означува активна тромбоза (44). Во хронична фаза на болеста постои значително намалување на миелоидните и еритроидните клетки, со големо присуство на плазмоцити и ретки мегакариоцити. Аплазија и хипоплазија на коскената срцевина е типичен патолошки наод кај хроничната фаза на болеста, а како резултат на тоа се јавува тешка периферна панцитопенија (31). Патохистолошките испитувања на заболените кучиња покажале дека 96 % од кучињата со хронична форма на МЕК имале плазмоцитоза на менингите. Како предилекциони

места се наведени мозочното стебло, средниот мозок и церебралниот кортекс. Кај 13 % од испитаните случаи се забележани и крварења во мозокот. Токму поради овие промени се очекувани и различни невролошки клинички манифестации (42). Офталмолошките промени се забележани кај кучиња кои се природно и експериментално инфицирани со *E. canis* (46, 47). Најкарактеристична патолошка промена на очите е поврзана со насобирање на плазмоцити околу вените во слојот на ганглиски клетки (43 %), како и околу крвните садови во белката. Антериорно билатерално воспаление на увеата и лезии на мрежницата се најчестите клинички наоди кај природно инфицирани кучиња (46, 48). Исто така, чест наод кај МЕК е чир на рожницата, некроза на белката, намалена продукција на солзи, како и ненадејно слепило, како резултат на субретинално крварење (46, 49). Кај 84 % од пациентите со МЕК се пронајдени микро или макроскопски крварења во срцето. Поновите истражувања укажуваат на тоа дека е зголемен ризикот за повреда на миокардот кај кучиња во акутна фаза на болеста (50). Експериментална инфекција кај кучиња со *E. canis* предизвикала интерстицијална пневмонија за време на акутната фаза од болеста, придружена со задебелување на алвеоларните септуми на белите дробови од инфилтрација со мононуклеарни клетки и макрофаги (44). Кај 98 % од кучињата инфицирани со *E. canis* е дијагностицирана инфилтрација на плазмоцити околу вените и артериите на кортикомедуларниот спој, како и инфилтрација на плазмоцити и хистиоцити во и над кортексот на бубрезите, што продолжува во кортикомедуларниот спој. Исто така се забележани лезии во вид на перивенуларен и перигломеруларен едем и фокални некрози на реналниот паренхим (44).

## 2.4. Клиничка манифестација

По угризот на инфицираниот крлеж, времето на инкубацијата на ерлихијата е околу 8 - 20 дена, што зависи од имунитетот на животното и патогеноста на причинителот. Инфекцијата со *E. canis* може да помине асимптоматски со месеци или брзо да се развијат тешки клинички симптоми. Манифестацијата на болеста може да зависи и од коинфекција со други заболувања кои се пренесуваат со истиот вектор, како *Babesia canis vogeli* и *Hepatozoon canis*. Се работи за мултисистемско заболување кое се манифестира во акутна, супклиничка или хронична форма. Ги зафаќа сите раси на кучиња, но германските овчари се особено приемчиви, со поизразени клинички знаци на болеста и повисок морбидитет и морталитет во споредба со другите раси (36, 51).

Акутната фаза од болеста се карактеризира со висока температура, депресија, летаргија, анорексија, лимфаденомегалија, спленомегалија и предиспонираност кон хеморагии кои обично се манифестираат со петехии на кожата, ехимози и епистакса. Акутната фаза на болеста трае од 2 до 4 недели. Офталмолошки промени како што се: anterioren *uveitis*, *choreoretinitis papiloedema*, крварење на мрежницата, периваскуларни инфилтрати, микротромбози во окуларни крвни садови со оклузија и одвојување на мрежницата, се исто така чест клинички симптом на болеста. Зголемениот вискозитет на крвта кој доведува до субретинално крварење и одвојување на мрежницата може да резултира со слепило. Дополнително, можна е појава на невролошки манифестации како резултат на менингитис и/или менингеално крварење (46).

За време на супклиничката фаза не се забележуваат клинички знаци на болеста. Кучињата се клинички здрави со слаба тромбоцитопенија, поретко анемија, додека серолошките испитувања може да покажат хипергамаглобулинемија (52). Сè уште не се разјаснети причините зошто некои кучиња прогресираат од супклиничка во хронична фаза на болеста, но се смета дека се поврзани со расата, имунолошкиот статус на животното, стресот, коинфекцијата со други бактерии/паразити, сојот и географската локација (53). Супклиничката фаза настанува веднаш по акутната и може да трае со денови (од 40 до 120 дена) или години, при што кучето останува перзистентно инфицирано без клинички симптоми, но со слаба тромбоцитопенија.

Слезената е најверојатно резервоарот на *E. canis* за време на супклиничката фаза и последен орган кој ја прима бактеријата пред елиминација. Заради тоа, секогаш кај овие кучиња мора да се земе предвид можноста за развивање на хроничната форма на ерлихиоза и се препорачува понатамошно третирање (39, 54).

Симптомите во хроничната фаза наликуваат на акутната, освен што се потешки. Бледило на видливите слузници, малаксаност, крварење и значително намалување на телесната тежина, губење на сјајот на влакното, се најчестиот клинички наод (40). Панцитопенија и хипоплазија на коскената срцевина се карактеристични знаци на хроничната фаза. Текот на болеста во оваа фаза често пати е искомплициран со суперинфекции од други микроорганизми кои кај многу кучиња може да прогресираат поради хипоплазија на коскената срцевина, што резултира со лоша прогноза (31, 55).

Некои од клиничките знаци во различните фази се преклопуваат, но сепак зачестеноста и тежината на клиничките манифестации се разликуваат во двете фази (акутна и хронична). Така на пример, крварењето е почест и потежок симптом во

хроничната фаза на болеста. Главно се манифестираат како петехии и ехимози на кожата и слузниците, епистакса (крварење од нос), хематурија (крв во урина), мелена и пролонгирано крварење, потоа улцеративно воспаление на устата и некротично воспаление на јазикот, едем на задните екстремитети и скротумот, иктерус (жолтило) и симптоми на централен нервен систем (31).

Епистаксата, која е карактеристичен симптом на болеста, предизвикана е од хеморагии во белите дробови или носната слузокожа. Генерално пациентите заболени од ерлихиоза немаат некои забележливи лезии како што се лизирање на клетки, формирање на апцеси или силна воспалителна реакција, посебно во акутната фаза на болеста (15).

## 2.5. Промени на хематолошките и биохемиските параметри

Особено се значајни хематолошките промени кои ги предизвикува оваа инфекција. Во акутната фаза на болеста типични хематолошки промени се умерена до тешка тромбоцитопенија, слаба до умерена нормохромна, нормоцитна нерегенеративна анемија и умерено намалување на вкупниот број на леукоцити. Кучињата кои ќе ја поминат оваа фаза, без терапија или со несоодветна терапија, може да преминат во супклиничка фаза, во која може да се забележи слаба до умерена тромбоцитопенија. Во хроничната фаза на болеста, карактеристичните хематолошки промени се резултат на хипоплазија на коскената срцевина и нарушена продукција на крвни елементи. Во оваа фаза се појавува силна нерегенеративна анемија, леукопенија и тромбоцитопенија. Нерегенеративната анемија и слабата леукопенија во акутната фаза на болеста се најверојатно резултат на нарушување на еритропоезата и леукопоезата, како резултат на неможноста на коскената срцевина да компензира во перифераната деструкција на еритроцити и леукоцити (56).

Тромбоцитопенијата кај инфекцијата со *E. canis* може да биде имунолошки индуцирана. Факторот на инхибиција на миграцијата на тромбоцитите со молекуларна тежина 150,000 до 190,000, кој е различен од антитромбоцитните антитела и е продуциран од лимфоцитите кај кучиња заразени со *E. canis*, се смета дека се причина за тромбоцитопенија (57). Механизмите кои учествуваат во патогенезата на тромбоцитопенијата при инфекција со *E. canis*, во акутната фаза на болеста се: зголемено трошење на тромбоцитите поради воспалителни промени на ендотелот на крвните садови, зголемена секвестрација на тромбоцитите во слезената и имунолошка

деструкција или повреда, што предизвикува значително намалување на животниот век на тромбоцитите (37).

Докажувањето на антиромбоцитните антитела (АТА) кај кучињата по експериментална инфекција со *E. canis* ја поткрепува претпоставката дека имунолошката деструкција на тромбоцитите исто така придонесува во патогенезата за тромбоцитопенија кај акутната ерлихиоза. Истовремено со развивањето на тромбоцитопенија за време на акутната фаза се појавува значително покачување на MPV (среден волумен на тромбоцитите), што укажува на активна тромбоза (58). Во тешката хронична фаза на болеста, тромбоцитопенијата е како резултат на намалена продукција на тромбоцитите поради хипоплазија на коскената срцевина (34). Како резултат на хипоплазијата на коскената срцевина, кучињата често развиваат панцитопенија во хронична фаза на болеста. Исто така доаѓа и до намалување на адхезивноста на тромбоцитите кај кучињата инфицирани со *E. canis*. Ова заболување ја инхибира агрегацијата на тромбоцитите. Сите овие наоди укажуваат дека дисфункцијата на тромбоцитите може да се појави во акутната фаза на болеста и заедно со тромбоцитопенијата се фактори кои придонесуваат за појавата на склоност кон крварење на заболените кучиња (37).

Најчести биохемиски промени на серумот се хипоалбуминемија, хиперглобулинемија и хипергамаглобулинемија. Електрофореза на протеините од серумот најчесто покажува поликлонска хипергамаглобулинемија, но може да се појават и моноклонски гамопатии. Умерено зголемување на концентрациите на аланин аминотрансферазата (ALT) и алкалната фосфатаза (ALKP) често се забележани кај кучињата во акутна фаза на болеста (40).

Најчести промени на серумските протеини во истражувањето на Nagus и sor. (35) биле хиперглобулинемија (57 % од кучињата), хипоалбуминемија (29 %) и хиперпротеинемија (18 %). Во однос на останатите биохемиски абнормалности, авторите забележале високи концентрации на алкална фосфатаза (ALKP) кај 56 % од испитаните кучиња, висока аланин аминотрансфераза (ALT) кај 36 %, зголемни концентрации на уреа кај 35 % и креатинин кај 29 % од кучињата (35).

Хипоалбуминемијата која се забележува кај МЕК може да биде како последица од загубата на албумини во едемите од инфламаторен флуид поради зголемената пермеабилност на крвните садови, губењето на крв или намалената продукција на протеините, поради оштетување на црниот дроб или пак може да биде последица на гломерулопатија (34, 58). Синтезата на протеините се регулира главно со онкотскиот

притисок. Намалување на концентрацијата на албумините може да делува како компензаторен механизам на состојбата на хиперглобулинемија, со што се одржува онкотскиот притисок и се превенира зголемување на вискозноста на крвта (34). Хипергамаглобулинемијата кај ова заболување вообичаено е поликларна. Концентрацијата на гама глобулините се зголемува за време на фебрилната фаза на ерлихиозата и перзистира за време на субклиничката и хроничната фаза (37). Концентрациите на  $\alpha$ 2- и  $\beta$ 2-глобулин исто така се покачуваат кај заболените кучиња. Покачувањето на концентрацијата на  $\alpha$ 2-глобулинот може да биде како последица на оштетување и воспаление, како што е претходно докажано, дека синтезата на  $\alpha$ 2-глобулин од страна на црниот дроб е стимулирана од ендогени медијатори на леукоцитите како одговор на оштетување на ткивото и воспаление (59).

Зголемена концентрација на протеините на акутна фаза е забележана во клиничкиот тек на ерлихиозата. Зголемена концентрација на Ц-реактивниот протеин (CRP) е забележана помеѓу 4 и 16 ден и го достигнува својот максимум на 15 и 42 дена по инокулација со *E. canis* (60). Промените во концентрациите на протеините на акутна фаза се поткрепни и во студијата на Rikihisa и сор. (61), каде што е забележано од 2 до 9-кратно зголемување на CRP и AAG (алфа кисел гликопротеин) кај сите испитани кучиња помеѓу 4, и 6. ден по инфекцијата. Покрај присуството на *E. canis* кај експерименталните кучиња, концентрациите на CRP и AAG постепено се намалиле до предекспозициското ниво до 34. ден. Овие промени се забележани и кај повеќето природно заразени кучиња со тешки клинички знаци, кои покажале зголемување на концентрациите на CRP и AAG во клиничкиот тек на болеста (61).

По акутната фаза на болеста, инфекцијата може да перзистира и покрај спонтаното клиничко закрепнување или неефективен третман, и овие животни можат да преминат во супклиничка фаза на болеста. Во супклиничката фаза се присутни слаби хематолошки абнормалности, слаба тромбоцитопенија и значително намалување на бројот на леукоцитите за разлика од прединфективната состојба поради намалување на бројот на неутрофилите. Но, во оваа фаза кучињата не се леукопенични или неутропенични. Овие параметри не треба да се занемарат бидејќи укажуваат на патолошки промени и животното е супклинички носител на *E. canis* (37, 52).

## 2.6. Протеини на акутна фаза - Ц-реактивен протеин (CRP)

Протеините на акутна фаза се компонента на реакцијата на акутната фаза која се појавува кратко по повреда на ткивата, најчесто предизвикано од инфекции, имунолошки, неопластични или трауматски причинители. Тие се неспецифични, вродени имунолошки компоненти кои се вклучени во обновувањето на хомеостазата на организмот и спречувањето на растот на микроорганизмите пред животните да развијат стекнат имунитет. Серумските концентрации на овие протеини се поврзани со тежината на заболувањето и степенот на оштетеност на ткивото на заболеното животно; затоа квантификацијата на нивната серумска концентрација може да обезбеди дијагностички и прогностички информации доколку на време се земе соодветен примерок (62).

Протеините на акутната фаза се состојат од „негативни“ и „позитивни“ протеини кои покажуваат намалување или покачување во нивото, како одговор на определена инфекција. Како негативни протеини се наведени албумини и трансферин, додека позитивни се глукопротеини кои се синтетизираат главно од хепатоцитите при стимулација од проинфламаторните цитокини и се ослободуваат во крвотокот. Во позитивни протеини на акутна фаза спаѓаат: хаптоглобин, CRP, серум амилоиден протеин А, церулоплазмин, фибриноген и ААГ (62).

Ц-реактивниот протеин (CRP) има важна улога во заштитата од инфекции, ослободување на оштетеното ткиво, превенција од автоимунизација и регулација на воспалителниот одговор. Во хуманата медицина е дефиниран како одличен сензитивен системски маркер за воспаление и оштетување на ткивото (63). Испитувањата под електронски микроскоп покажале голема сличност помеѓу кучешкиот и човековиот CRP, со таа разлика што две од подединиците на кучешкиот CRP се гликозирани (64).

Кучешкиот CRP има молекуларна тежина од 100 kD, се состои од 5 подединици од 20 kD секоја. Според структурата е цикличен пентамер кој се врзува со различни патогени бактерии или интрацелуларни антигени на оштетените клетки, на тој начин што ги препознава надворешните молекули и променетите молекули. Протеинот има други страни кои го активираат класичниот пат на комплементот, реагираат со специфични рецептори на фагоцитните клетки и посредуваат при фагоцитозата или предизвикуваат продукција на антиинфламаторни цитокини, со што го поврзуваат неспецифичниот вроден имунитет со специфичниот стекнат имунитет.

CRP има карактеристичен одговор кој е често истражуван кај кучињата. Концентрацијата на CRP во серумот се зголемува при различни нарушувања и најчесто

се поврзани со времетраењето и активноста на болеста (65, 66, 67). Најчесто користени методи за определување на нивото на CRP се ELISA, имунотурбидиметрија и латекс аглутинациски тест (62).

*Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) како метод ја комбинира специфичноста на антителата со сензитивноста на едноставните ензимски анализи, преку користење на антитела или антигени споени со лесно анализирачки ензими. Постојат повеќе типови на ELISA, еден од најчесто користените за детекција на CRP е „сендвич“ ELISA, која е високо ефикасна за детекција на антиген. Со овој метод се квантифицираат антигените помеѓу двата слоја на антитела. Антигенот кој се бара мора да содржи барем две антигенски епитопи способни за врзување со антитело, бидејќи барем две антитела учествуваат во сендвич-реакцијата. Може да се користат моно- или поликларни антитела за фаќање и детекција на антителата во ELISA сендвич-системите. Поликларните антитела се често користени заради можноста да фатат што е можно повеќе антигени. Предноста на овој метод е во тоа што примерокот не мора да се прочистува пред анализа и тестот може да биде многу сензитивен (2 до 5 пати посензитивен од директна или индиректна ELISA) (61).

Концентрацијата на CRP може да се определи со користење на имунотурбидометриската анализа која е наменета за анализа на примероци од луѓе, која во едно истражување покажала корелација од 0,98 со специфичната кучешка ELISA-анализа (66). CRP кај кучиња може да се мери со веродостојност и висока изводливост во однос на комерцијално достапните тестови CRP-TIA, дизајнирани за одредување на концентрација на хуман CRP со одлични аналитички перформанси, оценети со објективни аналитички стандарди (68). Дијагностичката сензитивност како маркер за воспаление е нарушена кај многу млади кучиња (< 3 месеци старост) и за време на средна гестација кај гравидни кучки (68).

Имунохемиските методи, каде што припаѓа и имунотурбидиметријата, овозможуваат едноставен, брз, сензитивен, и во најголем број случаи лесно апликативен метод за рутинска анализа во клиничките лаборатории. Овие методи вообичаено не бараат екстензивна и деструктивна подготовка на примероците или скапи инструменти. Имунохемиските методи во последно време брзо ги заменија хроматографските техники во клиничката дијагностика, при што овозможуваат детекција на антитела поврзани со специфични болести, биомаркери за болестите, хормони и фармацевтски супстанции (69).

Во однос на стабилноста и чувањето на Ц-реактивниот протеин, според податоците во литературата, не се забележани значителни промени во имунореактивноста при чување на 4 °C - 24 h, до 2 месеца на -20 °C и до 4 месеци на -10 °C (70, 71).

Сè уште е ограничен бројот на истражувања во врска со дијагностичките и прогностичките вредности на протеините на акутна фаза кај кучиња кои се природно инфицирани со *E. canis* (70). Во досегашните испитувања, зголемена концентрација на CRP и AAG се забележани кај кучиња кои се експериментално инфицирани со *E. canis* и нивната инфекција се намалува на прединокулаторна концентрација набрзо по преболување на акутната фаза на болеста. Одговорот на покачување на CRP е задоцнет затоа што размножувањето на овој микроорганизам е бавно. Високите концентрации на CRP се забележани кога на PCR е детектибилна 16s rRNK на *E. canis* (60, 61).

## 2.7. Дијагностицирање на заболувањето моноцитна ерлихиоза

*E. canis* предизвикува потенцијално фатално заболување кај кучињата и затоа бара брза и точна дијагностика, со цел навремена терапија и подобра прогноза. Клиничката манифестација на болеста може да биде разновидна, но во комбинација со хематолошкиот и бихемискиот наод може да се постави сомнеж за нејзино постоење. Поради сличната клиничка манифестација и наодот при клиничкиот преглед со дел од вектор-преносливите болести, секако дека е неопходна прецизна и точна дијагностика.

За време на акутната фаза, карактеристичен хематолошки наод е умерена до тешка тромбоцитопенија. Средниот волумен на тромбоцитите (MPV) има тенденција да се зголемува од 6. ден од инфекцијата. Тромбоцитопенијата во акутната фаза е придружена со слаба анемија и умерено намалени бели крвни клетки. За време на супклиничката фаза, бактеријата се повлекува во органите на кучето, особено во слезената. Кучињата се клинички здрави, но може да се забележат промени во хематолошката слика, како слаба тромбоцитопенија, намалување на бројот на леукоцитите и еритроцитите, иако овие промени се доста умерни и тешко можат да се забележат. Во хроничната фаза, тромбоцитопенијата е поизразена заедно со анемијата и леукопенијата. Панцитопенија настанува поради хипоплазија на коскената срцевина која е главна карактеристика за оваа фаза. Најчесто прогнозата со оваа форма на хронична ерлихиоза е неповолна, бидејќи терапијата најчесто нема ефект (40, 56). Кај хроничната

ерлихиоза, терапијата може да се пролонгира до нормализирање на клиничката состојба и хематолошките вредности.

Патогномоничен знак за миелосупресивната ерлихиоза е панцитопенија настаната како резултат на аплазија и хипоплазија на коскената срцевина. Понекогаш кај акутна моноцитна ерлихиоза се појавува панцитопенија со нормоцелуларна коскена срцевина и таа за разлика од апластичната панцитопенија, реагира на терапија. Поради скратениот живот на неутрофилите (4 - 8 часа) и на тромбоцитите (5 - 7 дена), споредено со еритроцитите (120 дена), маркантната анемија е обично последната абнормалност која настанува како резултат на прогресијата на апластичната панцитопенија. Иако лимфопенијата е почеста кај хронична ерлихиоза, може да се јави грануларна лимфоцитоза, најчесто пред аплазијата на коскената срцевина (31).

Дијагностиката на моноцитната ерлихиоза се поставува преку различни методи, со различен степен на сензитивност и специфичност за детекција на *E. canis*. Во минатото, моноцитната ерлихиоза била идентифицирана со користење на светлосен микроскоп и пронаоѓање на основните тела, иницијалните телца или морула во цитоплазмата на клетката домаќин, кои настануваат како резултат на мултиплицирањето на ерлихијата во моноцитите на домаќинот, во крвни размаски боени според *Romanowsky*. За жал, оваа техника има мала сензитивност и специфичност.

### 2.7.1. Преглед на крвен размаз

Детекцијата на цитоплазматичните морули типични за *E. canis* во моноцитите на крвен размаз, со помош на светлосен микроскоп, еден е од методите за дијагностика на МЕК. Морулите се вакуоли врзани за мембраната, вообичаено густо набиени со бактерии. За жал барањето на морули е тешко и долготрајно и се проценува дека со успешно од околу 4 % од случаите (34). Меѓутоа, се смета дека испитувањето може да се подобри со зголемување на бројот на размаски направени од *buffy-coat* (фракција од примерокот од полна крв кој ги содржи повеќето бели крвни клетки и тромбоцити, добиен со центрифугирање на крвта) кога значително се зголемува можноста за пронаоѓање на морулите на *E. canis*.

Според едно истражување, сензитивноста на методот е околу 66 % при преглед на 1 000 полиња под имерзија (зголемување x 1 000) на размаски од *buffy coat* (72). Меѓутоа, тромбоцитите, лимфоцитните азурофилни гранули и фагоцитирниот јадрен материјал може често пати да бидат помешани со инклузиите од ерлихија и други

микроорганизми од фамилијата *Anaplasmatacea* (*Ehrlichia chaffeensis*, *Neorickettsia risticii* и *Ehrlichia ruminantium*) кои исто така можат да ги инфицираат моноцитите кај кучињата (11, 73). Крвните размаски на инфицираните кучиња може дополнително да содржат реактивни моноцити, еритрофагоцитоза, тромбофагоцитоза, фагоцитоза на јадрен материјал или мегатромбоцити.

## 2.7.2. Серолошки дијагностички методи

Постојат неколку серолошки методи за детектирање на специфичните антиерлихија антитела кај кучињата. Една од почесто користените е индиректната имунофлуоресценца на антитела (IFAT) за детекција на IgG антитела за *E. canis* каде што титар на IgG  $\geq 1:40$  се смета за позитивен наод на *E. canis*. Антителата за ерлихија перзистираат неколку месеци до години по терапијата и елиминацијата на бактеријата (74).

Индиректна имунофлуоресценција (IFAT) претставува често употребувана техника за дијагностицирање на хумана и кучешка моноцитна ерлихиоза. Иако овој метод сè уште се користи, постои голема веројатност за лажно позитивни резултати поради вкрстена реакција со други бактерии од родот на *Ehrlichia*, *Anaplasma* и *Neorickettsia*. Денес се достапни други комерцијални серолошки тестови за дијагностика на ерлихиозата (на пр. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *immunoblot*, *competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (cELISA)) (75, 76, 77).

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) е техника која се користи во имунологијата за да се детектира присуството на антитела или антиген во примерокот. Овој метод на дијагностика често се користи во ветеринарната медицина. Исто така овој серолошки метод е доста корисен во дијагностиката на заболувањето (78).

Во едно истражување три различни ELISA-китови се споредени со IFAT-методот за детекција на анти *E. canis* IgG антитела: (1) ELISA-кит на база на *recombinant major antigenic protein2 (rMAP2)*; (2) *Immunocomb dot-ELISA test*, со користење на груб екстракт на ерлихија (Biogal, Galed Laboratories) и (3) SNAP3Dx-тест кој користи синтетски пептиди добиени од главните имунодоминантни протеини на *E. canis* P30 и P30-1 (Idexx Laboratories) (78). Примероците биле земени од кучиња кај кои е поставен сомнеж за инфекција со *E. canis* и од експериментално инфицирани кучиња. Квалитативната споредба на резултатите (позитивни/негативни) покажала 74,6 % (50/67 примероци) совпаѓање меѓу IFAT и трите ELISA-теста. Специфичноста на Immunocomb и Idexx 3Dx

SNAP биле доста високи (0,98 и 1,00). Авторите заклучиле дека dot-ELISA-китовите биле специфични и сензитивни особено за IFAT титар  $\geq 1:320$ .

Табела 2. Збир на позитивни и негативни резултати добиени со rMAP2-ELISA, Immunocomb1 and the Snap 3Dx-тест, споредено со IFAT (78).

IFAT-резултат	rMAP2-ELISA		Immunocomb		Snap1 3Dx	
	позитивни		позитивни		позитивни	
	негативни		негативни		негативни	
IFAT-позитивни	15	6	18	3	15	6
IFAT-негативни	7	39	1	45	0	46

Stillman и сор. (79) ја испитувале специфичноста и сензитивноста на Idexx Snap 4dx-тестовите, при што за *E. canis* како стандард го земале IFAT. Сензитивноста и специфичноста за детекција на *E. canis* била 97,8 % и 92,3 %, соодветно. За разлика од нив, Chandrashekar и сор. (80) објавиле дека сензитивноста и специфичноста на Idexx Snap 4d во однос на резултатите добиени со IFAT е 96,2 % и 100 %, соодветно.

Серолошката дијагностика на *E. canis* може да биде „спречена“ од антитела на други организми од родот *Ehrlichia*, кои прават вкрстена реакција, како на пример антителата за *E. canis* даваат вкрстена реакција со *E. ewingii*, *E. equi*, *E. risticii* и *Neorickettsia helminthoeca* микроорганизми кои не се присутни во нашиот регион (81).

Со методот IFAT не може да се направи диференцијација помеѓу *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* и *E. ruminantium* антитела (82). Исто така е забележана вкрстена реакција на *E. canis* антитела и *Anaplasma phagocytophilum* антиген, но не и со *Anaplasma platys*, предизвикувач на анаплазмоза кај кучињата (83). Ова треба да се земе предвид во областите каде што постојат овие заболувања.

Векторски преносливите болести како што се ерлихиоза, бабезиоза и лајшманиоза се најчесто застапените заболувања кај кучиња во тропските, суптропските и умерените климатски области во светот. Коинфекцијата со повеќе од еден патоген е честа појава поради големата застапеност на хематофагните вектори како што се крлежи и песочни муви и поради нивната можност за пренесување на повеќе патогени истовремено (84, 85). Поединечни автори во своите истражувања објавиле дека антителата против *E. canis* и *B. canis* даваат вкрстена реакција со *Leishmania* spp. Во серолошките тестови кои се користеле за детекција на инфекција со *Leishmania* spp. (86, 87). Клиничките и хематолошките наоди кај трите болести (лајшманија, бабезија,

ерлихија) се доста слични и серолошките резултати се особено значајни за диференцијална дијагностика.

*Western immunoblot* (превод објаснување) е посспецифична серолошка техника која може да помогне во карактеризирањето на инфективниот агент со давање на отпечаток (*fingerprints*) на неговиот имуноген протеински профил. Вообичаено се воспоставува хомогена шема помеѓу различните видови на *E. canis*, но сепак постои различност во антигените кај различните видови во различни региони на светот (88). *Western-immunoblotting* се користи за карактеризација и разграничување помеѓу различните организми кои предизвикуваат ерлихиоза, анаплазмоза или неорикециоза, и има потенцијал да ги реши дилемите предизвикани од вкрстената реакција. Овој метод се покажал корисен во разграничување на инфекциите со *E. canis* и *E. ewingii*, што е значајно бидејќи повеќето кучиња со *E. ewingii* имаат позитивен IFAT-титар на *E. canis* (40).

Интерпретацијата на добиените серолошките резултати мора да се изврши со помош на анамнезата и клиничките знаци, бидејќи присуството на повеќе инфекции пренесени од крлежи може да влијае врз клиничката манифестација.

### 2.7.3. Молекуларна дијагностика

Молекуларната детекција на родот *Ehrlichia* со *polymerase chain reaction (PCR)*, *nested-PCR* и *real-time PCR* се користи за откривање и идентификација на индивидуите заразени со ерлихија, во акутна или хронична фаза. PCR е посензитивен и посспецифичен метод во споредба со другите методи. Географската дистрибуција на некои типови *Ehrlichia* сè уште не е дефинирана, иако *E. canis* и *E. chaffeensis* се опишани во повеќе региони во светот (89, 90).

Серолошките методи, меѓу кои *IFAT*, *ELISA* и *WB* се ефикасни во детектирањето на антитела за *E. canis*, но нивни недостаток е неможноста за диференцирање на моменталната или изминатата инфекција, со што се ограничува нивната употреба во однос на потврда на болеста (91). Во прилог на ова е и истражувањето на McBride и сор. (92) кои забележале дека IgM и IgG-антителата не се детектираат во периодот од 1 до 3 недели по инфицирањето.

Полимераза верижната реакција е за првпат воведена во 1984 година од биохемичарот Kary Mullis и денес е една од најшироко користените техники во молекуларната биологија бидејќи е доста брз, едноставен и сензитивен метод.

Основниот принцип на PCR-методот е верижната реакција, односно од една DNK-молекула се создаваат две копии, потоа четири, осум и така натаму. Ова континуирано умножување на DNK се овозможува со специфични протеини - полимерази, ензими кои се способни да поврзат поединечни DNK-нуклеотиди за да се формира долга молекуларна низа. За да се изврши ова потребни се нуклеотиди составени од четири бази - аденин (А), тимин (Т), цитозин (Ц), гванин (Г). Исто така, потребен е и мал фрагмент од DNK, познат како прајмер на кои се закачуваат нуклеотидите и DNK-темплет за создавање на новите низи (93). Со овој метод на дијагностика се амплифицираат познати секвенци на нуклеински киселини, со помош на олигонуклеотидни прајмери кои се поврзуваат со бараниот сегмент од DNK и го мултиплицираат. Амплификацијата се одвива со користење на термостабилна DNK-полимераза. Ова е најсензитивен метод за детекција и карактеризирање на DNK од *E. canis*. Негативен PCR резултат означува дека не е детектирана таргетната DNK. Според истражувањата на Iqbal и сор. (94), детекција на DNK од *E. canis* може да се изврши на 4–10 дена по инокулација.

Најчесто користени примероци за детекција на DNK од *E. canis* се: полна крв, слезена, лимфни јазли, аспират од коскена срцевина, црн дроб и бубрези. Направени се повеќе истражувања во однос на тоа кој примерок е најсоодветен зависно од фазата на болеста. Според Vaneth и сор. (17), крв и слезена се подобри примероци за детектирање на моноцитната ерлихиоза кај природно и експериментално инфицирани животни со PCR-техниката, за разлика од брис од конјуктива. Според податоците од литературата, во хроничната фаза на болеста аспиратите од коскената срцевина се помалку сензитивни на PCR, за разлика од акутната фаза и во супклиничката форма на болеста најсоодветен примерок за PCR е аспират од слезена (54, 95). Сепак, како наједноставен и најмалку инвазивен примерок, а со тоа и најчесто користен е полна крв за детекција на DNK од *E. canis* (14, 40, 43, 89, 94, 96). Направени се неколку испитувања врз основа на различни таргет-гени (пр. 16S rRNK, p28, p30, dsb, VirB9), сепак најчесто користени се PCR врз основа на 16S rRNK и p30. nested PCR за p30 кој според истражувањата се покажал како посензитивен од 16S rRNK nested PCR (96), заради фактот дека *E. canis* содржи повеќе копии од p30-генот, но само една копија од 16S rRNK-генот.

Квантитативен real-time PCR (qPCR) е посензитивен метод од конвенционалниот PCR и овозможува квантификација на присутните бактерии. Овој метод се користи за квантификација на ерлихиозата кај заболените кучиња (17). За разлика од конвенционалниот PCR, квантитативниот е помалку подложен на контаминации, а доколку има некоја контаминација многу лесно може да се открие. Затоа овој метод сè

почесто се користи за дијагностика на *E. canis*. За разлика од конвенционалниот PCR, со qPCR се анализираат продуктите за време на реакцијата. Ова се постигнува со користење на различни флуоресцентни бои кои реагираат со амплифицираните продукти и се мерат со инструмент, со што се скратува и времетраењето на процедурата.

Опремата за *real-time PCR* дијагностика овозможува да се направат мултипли анализи за симултана детекција на неколку патогени во еден примерок, со што се развиени неколку multiplex qPCR-анализи за симултана детекција на *E. canis* и други организми (97).

## 2.8. Терапија на МЕК

Тетрациклините се антибиотици кои најчесто се употребуваат во терапијата на бројни бактериски заболувања кои ги пренесуваат крлежите, вклучувајќи ги и оние предизвикани од рикетии (34, 98). Како најупотребуван антибиотик од оваа група за терапија на МЕК е *доксициклинот*. Тој е добиен од окситетрациклин, со бактериостатски ефект на инхибиција на синтезата на протеините во бактеријата. Негова предност е тоа што е липофилен и може да преминува преку липидниот слој на бактеријата. *Доксициклинот* реверзибилно се врзува за 30-S и 50-S поединиците на рибозомите, при што го блокира поврзувањето на аминоксил транспортна рибонуклеинска киселина (tRNK) со информациска рибонуклеинската киселина (iRNK) и ја инхибира синтезата на протеини во бактеријата. Овој антибиотик се концентрира преку црниот дроб во жолчката и се екскретира во урината и фецесот во високи концентрации во биолошки активна форма (99).

Иако *доксициклинот* ефикасно ја подобрува клиничката слика на МЕК, постојат контрадикторни податоци во литературата за ефикасноста на исти терапевски протоколи за отстранување на инфекцијата со *E. canis* од домаќинот. Според некои истражувања, инфекцијата кај природно и експериментално инфицирани кучиња, во супклиничката фаза перзистира по терапијата со *доксициклин* во траење од 7 до 85 дена (74, 100, 101, 102), додека други укажуваат на отстранување на инфекцијата *E. canis* по 14 до 60-дневен третман со *доксициклин* кај кучиња со акутна МЕК (43, 103).

Со истражување на терапевтски протокол со *доксициклин* 10 mg/kg/ден во тек на 28 дена, авторите ја потврдиле ефикасноста при отстранување на причинителот од периферната циркулација за време на акутната и супклиничката фаза на болеста. Исто така нивните резултати покажале дека *E. canis* може да перзистира кај клинички

нормални кучиња, дури и по долготрајна терапија со *доксциклин*. Овие резултати се значајни заради можноста за повторување на болеста поради перзистенција на инфекцијата и затоа пациентите со ерлихиоза треба континуирано да бидат следени дури и по одличниот одговор на терапијата со *доксциклин*. Резултатите од ова истражување укажале дека фазата на моноцитната ерлихиоза кај кучињата може да влијае врз ефикасноста на терапијата со доксициклин за отстранување на инфекцијата со *E.canis* (98). Други истражувања укажале на тоа дека заболувањето било отстрането и бактеријата не била присутна во периферната крв на кучињата кога терапијата со *доксциклин* била давана за време на акутната и супклиничката фаза од болеста (43, 104).

Breitschwerdt и сор. (103) објавиле успешно отстранување на инфекцијата кај 8 од 8 кучиња со акутна експериментално предизвикана МЕК по 14 дена од терапија, додека Haggus и сор. (43) објавиле успешно отстранување на инфекција кај 5 од 5 кучиња по 16 дена од 60 дневен третман. Други истражувања укажуваат дека инфекцијата може да перзистира кај кучињата третирани и во хроничната фаза (100, 101, 102, 105). *Доксициклин* (10 mg/kg, еднаш на ден, минимум три недели) во комбинација со *имидокарп дипроприонат* (5 mg/kg, две апликации на интервал од 14 дена) е еден од препорачаните третмани на МЕК (53). Покрај претходно наведените комбинации, во литературата, како и во практиката, наведена е самостојната примена на *доксциклин*. Иако неколку истражувања покажале ефикасност при примена на имидокарп во *in vivo* услови во третман на ерлихиоза кај кучињата, повторното *in vitro* истражување покажало дека нема некаков позначаен ефект (106).

Од останатие лекови кои исто така имаат ефикасност против *E. canis* се: *тетрациклин хидрохлорид* (22 mg/kg, на 8 часа), *окситетрациклин* (25 mg/kg, на 8 часа), *миноциклин* (20 mg/kg, на 12 часа) и *хлорамфеникол* (50 mg/kg, на 8 часа) (107). Во литературата се среќаваат податоци за користење на *рифампицин*, инхибитор на В поединицата на DNK-зависна RNK-полимераза, во третирањето на моноцитната ерлихиоза кај кучињата, меѓутоа ефикасноста во отстранувањето на бактеријата во супклиничка или хронична фаза е делумна (98, 104). Во хуманата медицина *рифампицин* се користи за терапирање на пациенти со ерлихиоза кај кои доксициклинот е контраиндициран, при што предизвикува брзо клиничко закрепнување, иако неговата ефикасност во отстранувањето на бактеријата сè уште не е истражено (108). Друго истражување е направено за да се процени ефикасноста на *рифампицино*т во отстранувањето на *E. canis* од крвта, коскената срцевина и слезената, како и клиничките и хематолошките закрепнувања кај кучиња експериментално инфицирани, во акутна

фаза. Сите инфицирани кучиња останале серопозитивни за време на целата студија (98 дена) и не била забележана разлика помеѓу титарот на антитела за *E. canis* кај третираните и нетретираните кучиња. Врз основа на добиените резултати, авторите доше до заклучок дека *рифампицино*т има делумна ефикасност во елиминацијата на акутната инфекција, но значително ја подобрува тромбоцитопенијата, со што истиот може да се користи како алтернатива кај кучиња кои се нетолерантни на *доксициклин* (109).

*In vivo* истражувањата покажале различни резултати при што некои автори ја потврдиле ефикасноста на овој лек во третманот на ерлихијата, по 1 и 2 дози (110, 111), додека други добиле спротивни резултати (112). Во своето истражување, Kelly и сор. (106) укажуваат дека *in vitro* растот на *E. canis* не е попречен при краткотрајна (тродневна) примена на високи или ниски дози на *имидокарп дипроприонат*. Затоа е мала веројатноста за ефикасност на овој лек кај оваа бактерија.

Во истражувањето на Sainz и сор. (113), споредени се три терапевтски протоколи, 1 група третирана со *доксициклин* (10 mg/kg/ден 28 дена), 2 група со *имидокарп дипроприонат* (5 mg/kg дадени на 15 дена), и 3 група третирани со двата лека истовремено. Ефектот од *имидокарп дипроприонат* бил сличен со тој на *доксициклин*. Покрај фактот што крајниот резултат бил ист, резултатите од електрофорезата на серумските протеини и бројот на тромбоцити кај кучињата кои биле третирани само со *имидокарп дипроприонат* се вратиле во референтните вредности побавно од останатите 2 групи. Комбинираниот протокол на терапија со *доксициклин* и *имидокарп дипроприонат* немал никаква предност во однос на третманот само со *доксициклин* (113). Во однос на терпијата во супклиничката фаза на болеста Harrus и сор. (100), заклучиле дека 6-неделниот третман со *доксициклин* (10 mg/kg на 24 часа) не секогаш е доволен за да се отстрани причинителот од сите супклинички инфицирани кучиња и дека PCR на примероци од повеќе органи е метод кој треба да се користи за определување дали дошло до целосно излекување на МЕК.

До денешно време, испитувано е дејството на неколку видови антибиотици, вклучувајќи ги: *тетрациклини* (пр. хлортетрациклин, окситетрациклин, миноциклин, доксициклин), *макролиди* (пр. азитромицин), *флуорокинолони* (пр. енрофлоксацин), *хлорамфеникол*, *рифампицин* и *имидокарп дипроприонат*, како хемотерапевтски агенци против *E. canis*. Со исклучок на *тетрациклините* и *хлорамфениколот*, овие антибиотици не дале добри резултати. Заради несаканите ефекти на *хлорамфениколот*, користењето на овој лек при третирање на моноцитната ерлихиоза е прекинато и се

користи само во случаи кога не можат да се користат *тетрациклини*. Од тетрациклините, најдобар избор е *доксициклин* во дози од 5 mg/kg на 12 часа или 10 mg/kg на 24 часа за време од 3 до 4 недели кај кучиња во акутна фаза на болеста (30). Кучињата во супклиничка фаза на болеста се третираат малку подолго, врз основа на едно истражување каде што било забележано дека одреден дел од испитаните и третирани кучиња останале носители 28 дена по терапијата со *доксициклин*, заради што била потребна подолготрајна терапија (98). Моментално најчесто употребуван терапевтски протокол е 28 дена перорална апликација на *доксициклин* врз основа на препораките на Neer и сор. (114).

## 2.9. Прогноза

Според Mylonakis и сор. (95), големите раси кучиња имаат речиси секогаш лош исход при хронична ерлихиоза, за разлика од помалите раси, каде што со долготрајна терапија се постигнал успех. Прв знак на закрепнување било враќање на неутрофилите во нормални вредности, по што следеле тромбоцитите и еозинофилите (95). Прогностички фактори, индикатори за 100 % лоша прогноза кај кучињата со моноцитна ерлихиоза се сметаат: јака леукопенија, јака анемија, хипокалемија и пролонгирано aPTT (време на активација на тромбопластин), додека индикатори на преживување со веројатност од 100 % се WBC над  $5,18 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ , тромбоцити над  $89,5 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ , PCV > 33,5 %, а PTT под 14,5s и ниво на K во серумот над 4.75 mmol/L (115). Овие наоди одговараат со заклучоците од една ретроспективна студија на Nagus и сор., (35) каде што е наведено дека изразената анемија, леукопенијата, панцитопенијата, предиспонираноста кон крварења (особено епистакса) и расната предиспозиција се индикатори за лоша прогноза кај моноцитната ерлихиоза.

## 2.10. Превентива

Редовната заштита од крлежи е наједноставната превентивна мерка за ова заболување. Објавени се резултати од користењето на имидаклоприд со перметрин и фипронил кои обезбедиле одредена заштита на кучињата во поединечни области во Италија и Африка. Комбинацијата на *фипронил* и *амитраз* ја зголемуваат брзината на убивање и отпаѓање на припиените крлежи, со што обезбедува подобар превентивен ефект наспроти *фипронилот* (116, 117, 118). Комбинацијата на фипронил и перметрин има предност заради различниот модел на делување на двете супстанции: *перметринот*

има изразено репелентно дејство и при контакт предизвикува иритација и уништување, додека *фипронилот* предизвикува прогресивен морталитет кај крлежите, со што се смета дека оваа комбинација е ефикасна во намалување на преносот на *B. canis* и *E. canis* кај кучиња (119).

Сè уште не постои комерцијално достапна ефикасна вакцина против *E. canis*, така што контролата на крлежите останува најефективната превентивна мерка. Истражувањата на Rudoler и сор. (120) потврдиле дека атенуирана линија на *E. canis* (#611A) има потенцијал да ги заштити кучињата од МЕК и да послужи како вакцина за ова заболување. Ова истражување се надоврзува на претходно објавени резултати дека оваа атенуирана линија може да послужи како вакцина за МЕК (121). Атенуираната вакцина користена во ова истражување предизвикала силен одговор на антителата кој перзистирал за цело време додека траела студијата. Меѓутоа, ова се сè уште почетни резултати кои укажуваат дека атенуираната линија од *E. canis* (#611A) ја намалува сериозноста на клиничките знаци и бактериската инвазија кај кучињата по инфицирање со див сој. Според авторите, овие резултати укажуваат дека атенуираниот сој може да служи како вакцина во иднина, но потребно е дополнително подолготрајно испитување (120). Истражувањето на Mahan и сор. (122) за имунизацијата на кучињата со инактивирана *E. canis* заедно со Quil A (потентен стимулатор на клеточен и хуморален имун одговор) покажало дека предизвикува силен имунолошки одговор. Имунизацијата ги инхибирала микроорганизмите при инфекција со *E. canis* што значи дека може да биде користена во контролата на моноцитната ерлихиоза кај кучињата, бидејќи крлежите најчесто се инфицираат од кучиња во акутна фаза при бактериемијата. Сепак се потребни дополнителни испитувања во однос на режимот на имунизација, испитување на поголем број кучиња како и определување на нивото и типот на имунолошката реакција предизвикана против реазлично вирулентни соеви на *E. canis* (122).

## 2.11. Опасност за здравјето на луѓето

Кафениот крлеж *Rhipicephalus sanguineus* кој е примарниот вектор на пренесување на болеста е широко распространет. До сега, можноста за инфекција на луѓе со *E. canis* не е сериозно истражувана бидејќи овој крлеж ретко каснува човек. Во 1996 година, Perez и сор. (9) објавиле случај на инфекција со *E. canis* со клиничка слика кај луѓе во Венецуела која како тропска земја има голема инфестација на крлежи и силно присуство на *E. canis* помеѓу кучињата. Истражувањето на овие автори укажува на

идентична 16S rRNK-генска секвенца помеѓу ерлихија организмите од кучиња, крлежи и луѓе на исти географски регион во Венецуела и слични антигенски профили помеѓу изолатите од куче и човек, што укажува дека кучињата служат како резервоари за хуманата инфекција со *E. canis* и дека *R. sanguineus*, кој повремено гризнува луѓе во овој регион, може да послужи како вектор на болеста (123). Сепак во литературата не постојат доволно податоци за зоонотски карактеристики на *E. canis*.

### 3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Постојат голем број истражувања во литературата поврзани со клиничката слика, преваленцијата и дијагностиката на моноцитната ерлихиоза кај кучињата. Присуството на ова заболување во соседни земји на Р Македонија, како и голем број случаи во секојдневната клиничка практика нè поттикнаа да го започнеме ова истражување, каде што особен акцент е ставен на клиничките карактеристики, дијагностиката, спроведување на терапевтскиот протокол и следење на неговата успешност. Отежната и често пати погрешна или задоцнета дијагностика, воедно нè наведе на потребата од истражување на досега познатите дијагностички методи со цел подобрување на детекција на *E. canis*, како и следење на успешноста на спроведената терапија, заради што на самиот почеток од истражувањето ги поставивме следниве цели:

- Детален опис на клиничката манифестација на болеста, со дефинирање на карактеристичните хематолошки и биохемиски промени кај ерлихиозата кај кучиња.
- Одредување на концентрацијата на Ц-реактивниот протеин (CRP) и негова компарација помеѓу болни и здрави кучиња.
- Примена на различни серолошки тестови за детекција на антитела за *E. canis*.
- Примена на молекуларни дијагностички методи за детекција на DNA од *E. canis*.
- Споредбена анализа на резултатите од серолошките тестови и молекуларната дијагностика.
- Воспоставување на релевантен дијагностички пристап за ерлихиоза кај кучињата, почнувајќи од клиничката манифестација, преку лабораториските резултати, серолошките тестирања и молекуларната дијагностика.
- Следење на ефикасноста на спроведениот терапевтски протокол при терапија на МЕК.
- Споредбена евалуација на кучињата заболени од моноцитна ерлихиоза во зависност од полот, возраста, растот и превентивата.
- Серолошка дијагностика на евентуално присутна векторски пренослива коинфекција застапена во ендемското подрачје.

## 4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА РАБОТА

### 4.1. Животни и дизајн на студијата

Во ова истражување беа вклучени вкупно 124 кучиња од различна раса, пол и возраст од територијата на град Скопје. Кучињата беа групирани на следниот начин: здрави кучиња кои претставуваа контролна група ( $n = 40$ ) и болни кучиња ( $n = 84$ ). Во групата здрави кучиња беа вклучени кучиња без клинички симптоми за било какво заболување, со уреден наод на хематолошката и биохемиската анализа, како и негативен резултат на брз тест за детекција на антитела против *E. canis* (BioNote *E. canis* Ab Test Kit). Во групата болни кучиња припаѓаат оние кај кои врз основа на клиничката манифестација, клиничкиот преглед, хематолошките и биохемиските анализи, беше поставен сомнеж за постоење на инфекција со *E. canis*. Дополнително за понатамошните анализи, групата на болни кучиња беше поделена врз основа на резултатите од молекуларната дијагностика на две подгрупи: една подгрупа PCR+ ( $n = 36$ ), каде што припаѓаат кучињата кај кои серолошките тестирања и qPCR дадоа позитивен наод на ерлихија и втора подгрупа, кучиња PCR- ( $n = 48$ ) кои покажале позитивен резултат само на серолошките тестови, додека молекуларната дијагностика била негативна. Дополнително анализирана група беа и кучиња по завршувањето на терапискиот протокол (доксациклин 10 mg/kg еднаш дневно, 28 дена по ред) за моноцитна ерлихиоза ( $n = 43$ ) со цел да се утврди ефикасноста на терапијата преку клиничката манифестација, хематолошките и биохемиските анализи, како и присуство/отсуство на DNK од *E. canis* во полната крв (qPCR).

Со цел да се определи дистрибуцијата на болеста, сите кучиња беа поделени врз основа на:

- растот (мали, средни и големи),
- полот (машки и женски),
- возраста (адултни 1 - 8 години и геријатрија > 8 години) и
- превентивата (дали редовно е аплицирана заштита од ектопаразити или не).

Кучињата од секоја група и подгрупа беа споредувани меѓу себе, како и споредувани со контролната група во однос на клиничката слика, хематолошките и биохемиските отстапувања.

## 4.2. Клиничка и лабораториска дијагностика на МЕК

Детално беа земени анамнестички податоци, како и информации за појава на првите клинички знаци, присуството на крлежи и превентива, од сопствениците на кучиња болни од клиничка моноцитна ерлихиоза (МЕК). Кај најголем дел од нив (n = 74) беше направен детален клинички преглед (тријас, палпација на лимфни јазли и абдомен, аускултација на срце и бели дробови, преглед на конјунктиви и мукоза на природните отвори).

### 4.2.1. Подготовка и земање примероци за анализа

Од сите кучиња беше земена крв со венепункција на една од површинските периферни вени (*vene cephalicae antebrachii externa* или *vene saphenae*). Крвта беше земена во вакутејнер со антикоагуланс - EDTA за хематолошка анализа и qPCR и вакутајнер за серум за биохемиска анализа и детекција на антитела со методот ELISA. Серумот се одвојуваше со центрифугирање 30 min по земање на крвта на 1 500 вртежи за време од 5 минути. Хематологијата и биохемијата беа веднаш анализирани, додека за серологијата и молекуларната дијагностика, дополнителните анализи примероците беа чувани во ладилник на -20 °C.

### 4.2.2. Хематолошка и биохемиска анализа

Хематолошките анализи беа направени на ветеринарен хематолошки анализатор ExigoEosVet (Boule Diagnostics AB, Sweden) со специјална ветеринарна програма со помош на која се добиваат резултати за бројот на леукоцити и еритроцити, концентрација на хемоглобинот, хематокритот, бројот на тромбоцитите и диференцијалната крвна слика, изразена во релативни апсолутни вредности. Контролата на апаратот се вршеше еднаш месечно, со контролна полна крв со нормални вредности (Boule, Sweden), по препораките на производителот.

Биохемиската анализа на серумот беше направена на автоматизиран биохемиски анализатор ChemWell 2910 (Awareness Technology, INC, USA) за следните параметри – AST, ALT, ALKP, Albumin, Total protein, Globulin, Urea и Creatinin, според упатствата на производителот (Human, Germany). Ензимите и деградациските продукти беа одредени со кинетички спектрофотометриски методи, а протеинскиот статус беше одреден со спектрофотометриски методи со „мерење во една точка“. Контролата на апаратот се

вршеше еднаш месечно, со контролен серум (Humanrol, Human, Germany) со нормални вредности.

#### 4.2.3. Ц-реактивен протеин (CRP)

Концентрацијата на CRP во серум беше мерена кај болните кучиња, кај кучињата по терапија и кај контролната група здрави кучиња, со помош на хумана CRP имуно-турбидометрија (ТИА) за која постојат релевантни референци дека е валиден метод за употреба кај кучиња (68).

Анализите беа извршени на автоматски анализатор (gessanChem 200, Gessan, Italy) според упатството од производителот. Реагенсите се во суспензија на полистиренски латекс партикули со униформна големина обложени со IgG антихуман CRP. Кога примерокот (серум) се меша со реагенсот, доаѓа до аглутинација, која се мери турбидиметриски. Пред употреба реагенсите се оставаат на собна температура (15 - 25 °C). Реакцијата се отчитува на бранова должина од 540 nm, работна температура 37 °C, оптичка патека 1 cm. Реакцијата е линеарна до концентрација од 150 mg/L.

Референтни вредности со имунотурбидиметрија, според Kjelgaard-Hansen и сор. (124), се  $\leq 15,9$  mg/L.

### 4.3. Методи за серолошка детекција на антитела

Кучињата кои покажуваа клинички знаци беа тестирани со брз тест за детекција на антитела за *E. canis*. *E. canis* Ab Test Kit (BioNote, Korea) и SNAP4Dx (Idexx lab, Europe). Исто така беше извршена детекција на антитела за ерлихија со методот ELISA (Biopronix Ehrlichia 96, AGROLABO S.p.A. Italy).

#### 4.3.1 Одредување на антитела против *Ehrlichia canis* со комерцијални брзи дијагностички тестови

*Anigen Rapid E. canis Ab Test Kit (кат.бр. RB2105DD) BioNote Inc. Korea*

Принципот на работа на овој комерцијален дијагностички имуно-тест за квалитативна детекција на *Ehrlichia canis* антиела во примероци од серум, полна крв и плазма од кучиња е хроматографија. Китот е комерцијално подготвен за употреба и има прозорче на кое се означени „Т“ (тест-линија) и „С“ (контролна линија) линии. Овие две линии не се видливи за читање резултати пред апликација на примерок. Контролната линија е за контрола на тестот и треба секогаш да се појави кога тестирањето се изведува правилно

и доколку функционира тестот. Тест-линијата „Г“ се јавува доколку се присутни антитела за *E. canis* во испитуваниот примерок. Посебно селектирани антигени за *E. canis* се користат за интегрирање на тестот како материја за врзување и детекција. Ова овозможува добра прецизност на тестот.

*SNAP 4Dx plus test* ( Idexx Laboratories, Inc. Europe)

Овој тест врши симултана детекција на антитела за *Anaplasma phagocitophilum* и *A. platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* и *Ehrlichia ewingii*, како и *Dirofilaria immitis*, антиген во серум, плазма или полна крв од куче. Принципот на работа на тестот е со реверзибилна хроматографија на примерокот и автоматско последователно прелевање на растворот за перење и ензимскиот субстрат. Детекцијата на антитела против *A. phagocytophilum* се врши со помош на синтетски пептид извлечен од главниот протеин на надворешната мембрана (имунодоминантен р44 протеин) и антителата против *B. Burgdorferi* со користење на С6-пептидот добиен од IR<sub>6</sub> регијата од *Borrelia* мембранскиот протеин VlsE. Овој тест детектира антитела создадени против пептидите од р30 и р30-L протеините на *E. canis*, и вклучува две поликлонални антитела (едно за заробување и друго за детекција) за антигенот на *D immitis* (80).

#### 4.3.2. Одредување на антитела против *Ehrlichia canis* со ELISA-метод

Серумите од 84 кучиња за кои постоеше сомневање за заболувањето моноцитна ерлихиоза беа тестирани на специфичните антитела со методот на индиректна ELISA (Biorpox Ehrlichia 96). За изведба на тестот се користат микротитарски плочи на кои е нанесен познат антиген на *E. canis*. Ако испитуваниот серум содржи специфични антитела против *E. canis*, тогаш настанува нивно врзување за на несениот антиген. За откривање на ова нивно поврзување се користи анти кучешки имуноглобулин G кој е означен со HRP-ензим (коњугат). Овој коњугат има способност да се врзе за кучешките антитела против *E. canis* и да ја промени бојата на додадениот супстрат. На овој начин, преку спектрофотометриско отчитување на оптичката густина (ОГ), може да одредиме дали во испитуваниот кучешки серум се присутни специфични антитела против *E. canis*.

Покрај сите неопходни реагенси, китот содржи и два позитивни контролни серума и тоа силно позитивен серум и позитивен серум со гранична вредност (cut-off серум).

## ПРОТОКОЛ ЗА ИЗВЕДУВАЊЕ ELISA тестот

### *Подготовка на примероците:*

На плоча со „U“ дно прво се вршеше разредување на серумот со дилуент во сооднос 1/100. Секоја проба беше ставена во едно дупче. Сите потребни реагенси беа подготвени за употреба.

### *Тест-процедура:*

1. Сите компоненти од китот се оставаат на собна температура минимум 30 минути пред изведување на тестот.
2. Се додаваат 100  $\mu\text{L}$  од позитивната и негативната контрола во секоја плоча во дупликат. Серумите кои се претходно разредени се нанесуваат во секое дупче по 100  $\mu\text{L}$ . Плочата се покрива и се инкубира 10 минути на собна температура (20 - 25  $^{\circ}\text{C}$ ).
3. Внимателно се плакне секое дупче, 4 пати со пуфер за миење. Помеѓу секое миење плочата се превртува на апсорбирачка хартија за целосно да се отстрани заостанатиот раствор.
4. Се додаваат 100  $\mu\text{L}$  од конјугатот во секое дупче. Плочата се затвора и се инкубира 10 min на собна температура.
5. Се плакне како што е опишано во точка 3.
6. Се додаваат 100  $\mu\text{L}$  од TMB растворот во секое дупче. Се затвора и се инкубира 5 min.
7. Се додаваат 100  $\mu\text{L}$  од стоп-растворот во секое дупче.
8. Се одредува оптичката густина во секое дупче со помош на спектрофотометар BDSL Immunoscan Plus, со оптички филтер од 450 nm.

Резултатите од направеното тестирање се сметаа за валидни само доколку ги исполнуваа критериумите за валидност, и тоа:

- оптичката густина на силно позитивниот серум е повисока од 1 и
- оптичката густина на позитивниот серум со гранична вредност (cut off серумот) е повисока од 0,4.

### **Интерпретација на резултатите**

За интерпретација на резултатите и одредување на конечниот статус на испитуваните примероци, користена беше индексот на позитивност (ИП) пресметан според следната формула:

$$\text{ИП} = \text{ОГ}_{\text{ примерок}} / \text{ОГ}_{\text{ cut off серум}}$$

Примероците со ИП над 1,1 беа сметани за позитивни, а оние со ИП под 0,9 за негативни. Сите примероци кои имаа ИП помеѓу овие две вредности беа сметани за сомнителни и ретестирани.

#### **4.3.3. Испитување на присуството на антитела за *Leishmania infantum* со методот IFAT**

Одредување на антитела за *Leishmania infantum* со методот на индиректна имунофлуоресценца (IFAT)

Метод

1. Инактивација на серумот 30 min во водена бања на 56 °C.
2. Замрзнатите предметни стакла кои се прекриени со антиген се испираат со PBS и се сушат на собна температура.
3. Серумот се разредува во плочи со „U“ дно. Во првите дупчиња се нанесува по 195 µL а во останатите по 100 µL PBS. Во првите дупчиња се нанеува по 5 µL од серумот за испитување во разредување 1/40, а со префрлање на 100 µL од првото дупче во следните се постигнува разредување до 20 480.
4. Подготовка на позитивни и негативни контроли. Како екстерна позитивна контрола се користи кучешки серум позитивен на *Leishmania infantum* разреден во: PBS, 10 % говедски серум, 10 ppm proclin 300 (VMRD). Како интерна in-house позитивна контрола се користи серум од куче кое покажало титар 1:640 (позитивно со PCR). Како референтна негативна контрола се користи негативен кучешки серум разреден во: PBS, 10 % говедски серум, 0,09 % натриум азид (VMRD).

5. На сите 10 дупчиња од предметното стакло се нанесува испитаниот серум, почнувајќи од најголемото кон најмалото разредување. Позитивните и негативните контроли се нанесуваат на посебни стакленца.
6. Така подготвените стакленца се инкубират во влажна комора на 30 min на 37 °C.
7. Примероците од серум се отстрануваат со плакнење со PBS, проследено со имерзија на слајдовите во PBS во три последователни кадички во времетраење од 5 минути. Потоа се сушат на собна температура.
8. Во секое дупче се нанесува по 15 µL од разреден флуоресцин изотиоцијанат (ФИТЦ) конјугат анти имуноглобулин (козји-анти-кучешки FITC IgG, Sountern Biotech) според упатство на производителот.
9. Потоа следи инкубација 30 min на 37 °C. Повторно испирање се одвива на веќе опишаниот начин.
10. На слајдовите се нанесуваат по неколку капки од смеса од PBS/glycerol (50 %) и се гледа под флуоресцентен микроскоп Olympus.
11. Валидацијата на методот е направена со стандареден референтен серум.

Толкување на резултатите

Серумите со титар од 1:40 се негативни

Серумите со титар од 1:80 се сомнителни/гранични

Серумите со титар од  $\geq 1:160$  се позитивни

## 4.4. Молекуларна дијагностика на МЕК

### 4.4.1. Примероци за анализа

Како примерок за детекција на присуството на ДНК од *E. canis* беше користена полна крв од болни кучиња ( $n = 80$ ) пред започнување на терапевтскиот протокол, кај кои претходно со серолошко тестирање беа детектирани антитела за *E. canis*. Исто така, од некои од кучињата ( $n = 43$ ) беше земен примерок од полна крв за PCR по завршување на терапијата. Како позитивна контрола беше користена ДНК од *E. canis strain 105* (125).

#### 4.4.2. Прочистување на DNK од примероците од полна крв

За екстракција на DNK беше користен целосно автоматизиран систем за екстракција Sa Mag 24, Sacase. Волумен од 200  $\mu$ L од полната крв беа екстрахирани со соодветниот кит за полна крв (SaMag Blood DNA Extraction Kit, REF SM001) според упатството од китот.

#### 4.4.3. Детекцијана DNK од *Ehrlichia canis* со qPCR

За изведба на PCR-тестот беше користен TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4304437), комерцијален кит кој е оптимизиран и наменет за PCR-тестирања во кои се користат хидролизирачки проби. Китот ги содржи сите потребни компоненти за изведба на реакцијата, освен прајмерите и обележаната проба. Протоколот за подготовка на главната смеса (master mix) за тестирање на еден примерок, како и финалните концентрации на секоја од компонентите се прикажани во табелата 3.

Табела 3: Протокол за подготовка на главната смеса (master mix) за детекција на сегментот *E. canis* 16S со qPCR

Компонента	Волумен ( $\mu$ L)	Финална концентрација
Вода слободна од нуклеази	7,50	
2x RT PCR reaction mix for probes	12,50	1x
<i>E.canis</i> 16S Primer-probe mix*	2,00	0,8 $\mu$ M primer, 0,2 $\mu$ M probe
Вкупно	22,0	

Прајмерите и флуоресцентно обележаната проба беа синтетизирани од Applied Biosystems и при добивањето беа ресуспендирани со вода слободна од нуклеази во концентрација од 100  $\mu$ M. Потоа следувахе создавање на *E. canis* 16S primer-probe mix според протоколот опишан во табелата 4.

Табела 4: Подготовка на *E. canis* 16S primer-probe mix и секвенци на прајмерите

Олигонуклеотид (Концентрација)	Секвенца (5' - 3')	Волумен	Концентрација во миксот
--------------------------------	--------------------	---------	-------------------------

E.c 16S fwd	TCGCTATTAGATGAGCCTACGT	20	10
E.c 16S rev	GAGTCTGGACCGTATCTCAGT	20	10
E.c 16s probe		5	2,5
H <sub>2</sub> O		155	

Во PCR-стрипчиња со дупчиња од 0,2 mL аликвотирани беа по 22  $\mu$ L од подготвената главна смеса и додадени по 3  $\mu$ L од прочистената DNK добиена од примероците. При секое тестирање имаше вклучено по една слабо позитивна контрола и најмалку една негативна контрола. Реакцијата се одвиваше во Quant Studio 5, Real Time Thermal Cycler по температурен режим прикажан во табела 5.

Табела 5: Температурен протокол за qPCR тестирањето

Чекор	Време/температура	Повторувања
Инкубација на uracil-N-glycosylase	2 минути, 50 °C	1
Денатурација/активирање на Taq-полимеразата	10 минути, 95 °C	1
Полимераза верижна реакција: - денатурација - прилепување на прајмерите	15 секунди, 95 °C 60 секунди, 60 °C	45

Со помош на оптичкиот систем на Real-Time Thermal Cycler се мереше интензитетот на флуоресценција, на крајот на секој чекор на прилепување на прајмерите (annealing) и беше графички прикажан како функција во однос на бројот на циклуси. За позитивна реакција беше сметана онаа која имаше забележително акумулирање на флуоресцентен сигнал во вид на сигмоидална амплификациска крива и  $C_t < 40$ .  $C_t$ -вредноста го означува бројот на циклуси кои се потребни за флуоресцентниот сигнал да го надмине пресметаното ниво на флуоресценција кое потекнува од позадината (background level). Оваа вредност е обратнопропорционална со количината на специфичната DNK во примерокот (пониска  $C_t$ -вредност, значи поголема количина на DNK во примерокот и обратно) и претставува релативна мерка за концентрација. На овој

начин, преку добиената Ct-вредност, може да се направи семиквантитативна споредба на концентрацијата на DNK во тестираните примероци.

Валидноста на негативните PCR-резултати беше потврдена преку тестирање на посебен DNK-фрагмент (интерна контрола) кучешки бета актин (Canine beta actin) (Canine actin fwd GCGCAAGTACTCTGTGTGGAT, Canine actin rev GTCGTAACCTGCTTGCTGAT, Canine actin probe JUN - TCCTGGCCTCACTGTCCACSTTCCAGCA-QSY) - табела 6.

Табела 6. Подготовка на primer-probe mix за детекција на интерната контрола

	Концентрација	Волумен	Концентрација во смеса	Концентрација во реакција
<b>Canine b-actin_F</b>	100 $\mu$ M	5	2,5	0,25 $\mu$ M
<b>Canine b-actin_R</b>	100 $\mu$ M	5	2,5	0,25 $\mu$ M
<b>Canine b-actin_P</b>	100 $\mu$ M	3	1,25	0,12 $\mu$ M
<b>H2O</b>		<b>187</b>		
<b>ВКУПНО</b>		200		

Стандардната крива беше добиена со тестирање на сериски, десеткратни разредувања на контролната DNK. Секое разредување беше тестирано во дупликат.

#### 4.5. Терапевтски протокол за МЕК

Кај сите кучиња беше спроведен терапевтски протокол со *доксциклин* (10 mg/kg/24 h - 28 дена), според препораките на Neer и сор. (114). По завршување на терапијата беа земени примероци за хематологија, биохемија, qPCR.

## 4.6. Статистичка анализа на податоците

### 4.6.1. Клинички симптоми

За анализа на добиените податоци во однос на клиничката манифестација на болеста, користевме дескриптивна статистика за секој параметар поединечно, помеѓу подгрупите PCR+ и PCR-; додека за застапеноста на секој симптом помеѓу подгрупите се користеше Fisher exact test. Исто така беше направена споредба на комбинации на симптоми и нивната застапеност кај подгрупите со Fisher exact test.

### 4.6.2. Споредба на хематолошките и биохемиските параметри

Анализата на хематолошките и биохемиските резултати беше направена со помош на тестот Shapiro-Wilk за дистрибуција на податоците. Компарацијата помеѓу подгрупите:

- помеѓу групата болни и здрави животни, како и споредба;
- помеѓу животни по терапија и здрави беше анализирана со помош на Mann-Whitney U Test или Студентов Т-тест.

Споредбата на хематолошките и биохемиските параметри кај кучињата пред и по терапијата беше направена со примена на Wilcoxon Matched Pairs Test и Т-тест на зависни примероци.

### 4.6.3. Споредби на резултатите од серолошките тестови и qPCR

Серолошките тестови беа споредувани еден со друг, на исти примероци, со користење на „Анализа на совпаѓање“ (Agreement analysis) и Cohen's Kappa Statistics. За потврда на степенот на усогласеност помеѓу серолошките тестови е направена е споредба помеѓу секои два теста со 2 x 2 Contingency tables и Пирсонов хи-квадрат тест на независни варијабли.

Со цел да се споредат резултатите од трите серолошки тестови, ги зедевме пробите PCR+ за сигурно позитивни (златен стандард) и ги споредивме со позитивните резултати добиени со серолошките тестови. Споредба на серолошките тестови со PCR-позитивните примероци се изврши со примена на Attribute Agreement Analysis.

Дополнително, направена беше споредба на PCR-резултатите (позитивни и негативни) со резултатите од серолошките тестови за потврда на степенот на

усогласеност тестовите. Направена е споредба помеѓу резултатите од секој серолошки тест со PCR-резултатите со 2 x 2 Contingency tables и Пирсонов хи-квадрат тест на независни варијабли.

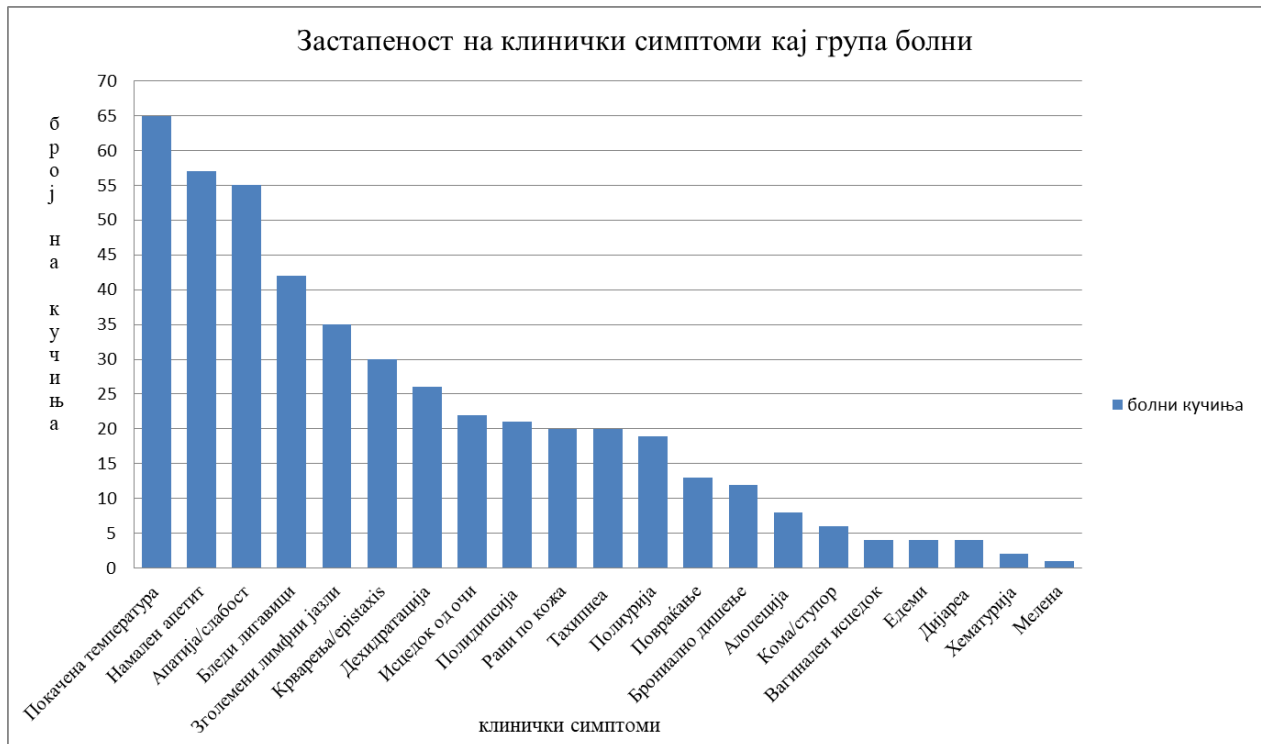
#### **4.6.4. Застапеност на болест**

Дополнително е направена дескриптивна статистика помеѓу групите: пол, возраст, раст и превентива наспроти застапеноста на болест, како и Фишеровиот тест за утврдување на значајна разлика помеѓу различните групи и застапеноста на болест. Тестот хи-квадрат е направен помеѓу групите во раст и застапеноста на болеста, а приспособените резултати се тестирани со цел да се утврди евентуалната разлика.

## 5. РЕЗУЛТАТИ

### 5.1. Клиничка манифестација на болеста

Од вкупно 84 кучиња кои ја сочинуваа експерименталната група, клиничката слика беше опишана кај 74. Како најчест клинички симптом во финалната група беше покачената телесна температура ( $> 39,5^{\circ}\text{C}$ ) со 87,84 % од болните кучиња, анорексија кај 77,03 %, апатија/слабост кај 74,32 %, бледи лигавици (56,76 %) (графикон 1).

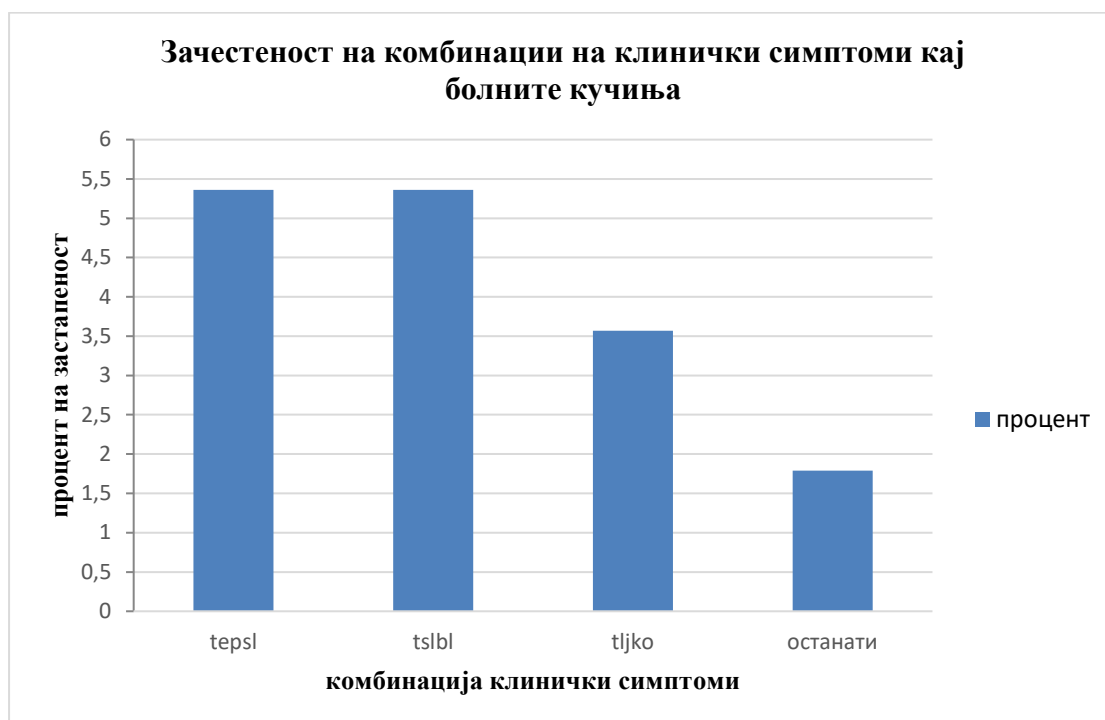


Графикон 1. Застапеност на клиничките симптоми кај болните животни

Во однос на застапеноста на клиничките симптоми по органски системи, најчесто зафатен беше дигестивниот систем со 74,32 %, кардиоваскуларниот со 50 %, лимфниот систем со 45,95 % итн. (графикон 2 и 3).



Графикон 2. Зафатеност на органските системи кај кучиња болни од МЕК



\*tepsl = температура, епистакса, слабост. tslbl = температура, слабост, бледи лигавици.

tljko = покачена температура, зголемени лимфни јазли и промени на кожа.

Графикон 3. Застапеност на комбинации од клинички симптоми кај кучиња со МЕК

Споредбата на клиничките симптоми, како и комбинација на симптоми помеѓу подгрупите PCR+ и PCR-, анализирана со Fisher exact test, не покажа статистичка значајност ( $p > 0,05$ ).



Слика 3. Епистакса кај куче со МЕК



Слика 4. Конјуктивитис кај куче со МЕК



Слика 5. Бледи / анемични слузници

## 5.2. Хематолошки параметри

Генерално гледано, во однос на застапеноста на хематолошките промени во групата на болни животни, тромбоцитопенијата беше присутна кај вкупно 80 од 85 кучиња (95,24 %).

Бројот на еритроцити беше намален кај 63 кучиња (75 %), додека кај 21 животно (25 %) бројот на црвените крни клетки не покажа никакво отстапување од нормалните физиолошки вредности. Намалениот хематокрит беше забележан кај 67 кучиња (79,76 %), додека намалување на хемоглобинот под референтните вредности беше забележано

кај 54 (64,29 %) животни од експерименталната група. MCV (среден корпускуларен волумен) беше со намалена вредност кај 55 болни кучиња (65,48 %), зголемување на вредностите на MCHC (средна концентрација на хемоглобин во корпускулите) беше забележано кај 61 животно (72,62 %).

Во однос на белите крвни клетки кај поголем број на кучиња 55 (65,48 %) немаше промени, леукопенијата беше застапена кај 20,24 % од пациентите. Лимфопенијата беше присутна кај 25 % од болните кучиња кај 19,1 % беше забележана моноцитоза, неутропенија кај 21,4 %, додека бројот на еозинофилите во најголем број болни кучиња (80,9 %) беше во рамките на референтните вредности.

Споредбата на хематолошките параметри помеѓу групата болни животни и контролната група покажа статистичка значајност во однос на бројот на еритроцити. Групата болни животни имаа пониска вредност ( $4,57 \pm 0,19$ ) во однос на групата здрави животни ( $6,58 \pm 0,13$ ); хематокритот и хемоглобинот кај групата болни животни беа пониски ( $26,37 \pm 1,27$  и  $9,76 \pm 0,53$  соодветно) во однос на групата здрави ( $35,35 \pm 0,77$  и  $16,38 \pm 0,36$ ). Тромбоцитите во групата болни животни беа со пониска вредност ( $89,32 \pm 8,28$ ) во однос на група здрави животни ( $261,95 \pm 14,69$ ). Истото беше забележано и со еозинофилите, кај групата болни животни беа значително пониски ( $0,30 \pm 0,06$ ) во однос на групата здрави животни ( $0,93 \pm 0,12$ ).

При компарација на хематолошките параметри помеѓу подгрупите PCR+ и PCR- статистички значајна разлика имаше во бројот на лимфоцитите, односно во подгрупата PCR- имаше пониска вредност на лимфоцитите ( $2,24 \pm 0,35$ ) во однос на подгрупата PCR+ ( $3,29 \pm 0,43$ ). Исто така, статистичка значајност беше присутна во бројот на моноцитите кои кај групата PCR- беа во помал број ( $0,94 \pm 0,14$ ) во однос на PCR+ ( $1,38 \pm 0,21$ ). Статистички значителна разлика помеѓу групите болни и кучиња по терапија има во однос на следниве параметри: еритроцити, хематокрит, хемоглобин и тромбоцити (табела 7).

Статистички значајни резултати беа добиени и при споредбата на контролната и групата кучиња после терапијата, и тоа за следниве параметри: еритроцитите во групата болни животни после терапија беа пониски ( $5,648 \pm 0,21$ ) во споредба со здравите ( $6,58 \pm 0,13$ ), вредноста на хемоглобинот во групата болни животни после терапија повторно беа пониски ( $13,13 \pm 0,44$ ) во споредба со здравите животни ( $16,38 \pm 0,36$ ). Истото се однесува и на еозинофилите кај групата болни животни по терапија беа пониски ( $0,43 \pm 0,08$ ) во однос на групата здрави животни ( $0,93 \pm 0,12$ ) (табела 7).

Табела 7. Хематолошки параметри кај болните и здравите кучиња.

Параметар, мерна единица	Референтна вредност,	Подгрупа PCR+ (n = 36)		Подгрупа PCR- (n = 48)		Група болно (n = 84)		Контролна група- Здрави (n = 40)		Група по терапија( n=43)	
		Средна вредност±SE	Опсег	Средна вредност±SE	Опсег	Средна вредност±SE	Опсег	Средна вредност±SE	Опсег	Средна вредност±SE	Опсег
Црвени крвни клетки (RBC) x 10 <sup>12</sup> /L	5,5 – 8,5	<b>4,92±0,28<sup>ac</sup></b>	1,69-7,85	<b>4,31±0,26<sup>ac</sup></b>	1,53 - 8,29	<b>4,57±0,19<sup>ac</sup></b>	1,53 - 8,29	6,58±0,13	4,93 - 8,10	<b>5,648±0,21<sup>a</sup></b>	2,74 - 8,26
Хематокрит (HCT) %	37 – 55	<b>28,96±1,92<sup>ac</sup></b>	9,60-52,16	<b>24,42±1,65<sup>ac</sup></b>	7,40 - 51,49	<b>26,37±1,27<sup>ac</sup></b>	7,40 - 52,16	35,35±0,77	23,90 - 44,30	32,66±1,48	15,50 - 56
Хемоглобин (Hgb), g/dL	12 – 18	<b>11,19±0,55<sup>ac</sup></b>	3,90-16,70	<b>9,76±0,53<sup>ac</sup></b>	3,30 - 16,40	<b>10,38±0,39<sup>ac</sup></b>	3,30 - 16,7	16,38±0,36	23,90 - 44,30	<b>13,13±0,44<sup>a</sup></b>	6,40 - 18,10
Тромбоцити (PLT) *10 <sup>9</sup> /L	200 – 500	<b>82,47±9,93<sup>ac</sup></b>	7,00-200,00	<b>94,46±12,47<sup>ac</sup></b>	3,00 - 542,00	<b>89,32±8,28<sup>ac</sup></b>	3,00 - 542,00	261,95±14,69	156,00 - 652,00	240,25±15,07	16,00 - 521,00
Бели крвни клетки (WBC) *10 <sup>9</sup> /L	6,0 – 17,0	11,35±0,98	2,00-27,80	11,72±1,16	3,10 - 38,90	11,56±0,78	2,00 - 38,90	11,05±0,54	5,10 - 18,10	10,48±0,69	3,7 - 26,19
Неутрофили *10 <sup>9</sup> /L	3,5 – 12,0	6,46±0,78	0,15-21,00	10,69±2,19	0,52 - 92,20	8,88±1,31	0,15 - 92,20	6,91±0,37	3,00 - 12,90	6,39±0,58	1,50 - 21,21
Лимфоцити*10 <sup>9</sup> /L	1,2 – 5,0	<b>3,29±0,43<sup>b</sup></b>	0,10-9,52	<b>2,24±0,35<sup>b</sup></b>	0,16 - 13,87	2,69±0,28	0,10 - 13,87	2,33±0,15	0,41 - 5,30	2,70±0,28	0,20 - 7,70
Моноцити*10 <sup>9</sup> /L	0,3 – 1,5	<b>1,38±0,21<sup>b</sup></b>	0,20-6,32	0,94±0,14	0,17 - 6,70	1,13±0,12	0,17 - 6,70	0,85±0,05	0,40 - 1,60	0,95±0,12	0,14 - 5,10
Еозинофили*10 <sup>9</sup> /L	0,1 - 1,25	<b>0,43±0,12<sup>a</sup></b>	0,00-2,90	0,43±0,12	0,00 - 2,90	<b>0,30±0,06<sup>a</sup></b>	0,00 - 2,90	0,93±0,12	0,10 - 2,80	<b>0,43±0,08<sup>a</sup></b>	0,00 - 2,50

<sup>a</sup> статистички значителна разлика (p < 0,01) помеѓу групите со контролната група

<sup>b</sup> статистички значителна разлика (p < 0,05) помеѓу подгрупа PCR+ и PCR-

<sup>c</sup> статистички значителна разлика (p < 0,01) помеѓу групите болно, PCR+, PCR- со група по терапија

### 5.3. Биохемиски параметри на серумот

Покачување на AST над референтната вредност кај болните кучиња беше присутно кај 21 од вкупно 84 испитани кучиња (25 %), ALT кај 50 кучиња (59,52 %), додека вредноста на ALKP беше покачена кај 53 кучиња (63,10 %). Концентрацијата на вкупните протеини во серумот кај болните кучиња беше намален кај 32 животни (38,55 %), хипоалбуминемијата беше застапена кај 66 (79,52 %), додека кај 43 (51,19 %) кучиња беше забележана хиперглобулинемија. Зголемена концентрација на уреа беше забележана кај 19 болни кучиња (22,62 %), додека креатининот беше покачен кај 22 испитани кучиња (26,19 %).

Статистичката анализа на биохемиските параметри помеѓу болни и здрави животни покажа сигнификантна разлика ( $p < 0,01$ ) во однос на албумините и вкупните протеини кои кај групата болни животни имаа значително пониска вредност во однос на групата здрави животни, како и алкална фосфатаза која во групата болни животни имаше повисока вредност во однос на групата здрави животни (табела 9). Анализата на податоците од подгрупите пред терапија покажаа дека нема статистички значајни разлики во однос на биохемиските анализи.

Споредувајќи ги добиените вредности од биохемиската анализа, статистички значителна разлика ( $p < 0,01$ ) кај кучињата пред и по терапија беше забележана кај следниве параметри: ALKP, каде што пред терапија беше забележана повисока концентрација ( $266,39 \pm 37,24$ ) во споредба со примероците по терапија ( $162,35 \pm 36,54$ ); вредностите на албумините (ALB) пред терапија беа пониски ( $20,54 \pm 0,68$ ) во споредба со вредностите по терапијата ( $24,11 \pm 0,87$ ).

Споредбата на биохемиските параметри помеѓу здравите животни и животните после терапија покажа значителна разлика ( $p < 0,01$ ) за: ALKP групата болни животни по терапија имаше повисоки вредности ( $162,35 \pm 36,54$ ) во однос на контролната група ( $84,52 \pm 14,82$ ), албумините и вкупните протеини по терапијата беа пониски ( $24,11 \pm 0,87$  и  $58,74 \pm 1,82$ ) во споредба со контролната група ( $28,87 \pm 0,71$  и  $67,49 \pm 1,37$ ) (табела 9).

Анализите на резултатите добиени за Ц-реактивниот протеин за групите здрави, PCR+ , PCR- и по терапијата не покажаа статистичка значителност (табела 8).

Табела 8. Добиени вредности за CRP кај групите на кучиња

	Подгрупа PCR+ (n = 36)	Подгрупа PCR- (n = 47)	По терапија (n = 42)	Здраво (n = 22)
CRP (< 15,9 mg/L)	7,16±0,67	9,05±1,01	6,43±0,82	6,7±0,71

Табела 9. Биохемиски параметри кај болните и здравите животни

Параметар, мерна единица	Референтна вредност,	Подгрупа PCR+ (n = 36)		Подгрупа PCR- (n = 48)		Група болно (n = 84)		Контролна група - здрави (n = 40)		Група по терапија (n=43)	
		Средна вредност ± SE	Опсег	Средна вредност ± SE	Опсег	Средна вредност ± SE	Опсег	Средна вредност ± SE	Опсег	Средна вредност ± SE	Опсег
Аспартат аминотрансфераза (AST), U/L	8,9 - 48,5	48,48 ±8,19	3,64 - 290,00	36,89±3,03	4,42 - 124,27	41,86±3,94	3,64 - 290,00	31,26±1,70	6,76 - 58,24	32,26±2,52	8,06 - 91,77
Аланин аминотрансфераза (ALT), U/L	8,2 - 57,3	102,90±21,66	10,60 - 761,80	93,40±12,26	17,06 - 457,68	97,47±11,56	10,60 - 761,80	70,44±6,12	21,88 - 188,58	58,68±5,95	9,19 - 166,71
Алкална фосфатаза (ALKP), U/L	10,6 - 100,7	<b>345,78±77,08<sup>ab</sup></b>	42,10 - 2169,00	<b>206,85±28,14<sup>ab</sup></b>	32,70 - 961,90	<b>266,39±37,24<sup>ab</sup></b>	32,70 - 2169,00	84,52±14,82	5,7 - 393,80	<b>162,35±36,54<sup>a</sup></b>	29,60 - 1382,80
Албумини (ALB), g/L	25,8 - 39,7	<b>20,71±0,99<sup>ab</sup></b>	5,97 - 35,77	<b>20,40±0,94<sup>ab</sup></b>	8,79 - 35,15	<b>20,54±0,68<sup>ab</sup></b>	5,97 - 35,77	28,87±0,71	21,56 - 43,19	<b>24,11±0,87<sup>a</sup></b>	11,86 - 37,00
Глобулини (GLOB), g/L	20,6 - 37,0	34,92±2,75	5,18 - 71,18	41,10±2,40	10,77 - 73,85	38,42±1,83	5,18 - 73,85	38,23±1,74	18,98 - 58,45	34,62±2,10	6,19 - 80,20
Вкупни протеини (Tot Prot), g/L	55,1 - 75,2	<b>55,64±2,57<sup>a</sup></b>	31,41 - 85,79	<b>61,51±1,97<sup>a</sup></b>	34,29 - 95,10	<b>58,97±1,60<sup>a</sup></b>	31,41 - 95,10	67,49±1,37	47,60 - 85,60	<b>58,74±1,82<sup>a</sup></b>	32,18 - 96,90
Уреа, mmol/L	3,1 - 9,2	9,72±2,08	1,72 - 60,65	9,71±1,54	1,79 - 45,00	9,71±1,25	1,72 - 60,65	6,24±0,33	2,56 - 10,59	6,10±0,76	1,92 - 27,81
Креатинин, μmol/L	44,3 - 138,4	146,82±39,06	12,15 - 1471,16	138,98±15,71	21,37 - 511,00	142,34±18,86	12,15 - 1471,16	95,52±6,98	19,79 - 207,34	96,88±7,79	25,00 - 277,63

<sup>a</sup> статистички значителна разлика (p < 0,01) помеѓу групите и подгрупите со контролната група здрави животни

<sup>b</sup> статистички значителна разлика (p < 0,01) помеѓу групите болно, PCR+, PCR- со група по терапија.

#### 5.4. Застапеност на болеста според превентива, старост и пол на кучињата

Дистрибуцијата на болеста според возраста на кучињата, полот и превентивата е прикажана во табела 10. Во однос на превентивата Fisher exact test покажа сигнификантна разлика ( $p < 0,01$ ) помеѓу здравите кучиња кои се со превентива 100 % и болните кучиња.

Табела 10. Дистрибуција на МЕК според превентива, возраст и пол

	група болни	група здрави	Fisher exact test
превентива			
да	47,50 %	100,00 %	<b>p &lt; 0,01</b>
не	52,50 %	0,00 %	
Возраст			
a (1 - 8г)	79,49 %	87,50 %	p > 0,05
g (> 8г)	20,51 %	12,50 %	
Пол			
m - машки	55,95 %	60,00 %	p > 0,05
f - женски	44,05 %	40,00 %	

#### 5.5. Резултати од серолошките испитувања

Табела 11. Приказ на резултатите од серолошките тестови за антитела за *E. canis*

Серолошки тест	Позитивни n (%)	Негативни n (%)
BioNote E. canis Ab Test Kit (n = 82)	74/90,2	8 (9,8)
SNAP 4Dx Plus test (n = 82)	66 (80,5)	16 (19,5)
ELISA Biopronix Ehrlichia 96 (n = 84)	80 (95,2)	4 (4,8)

Сите здрави кучиња (контролна група,  $n = 40$ ) беа тестирани со BioNote, при што се добија негативни резултати. Резултатите добиени од ELISA Biopronix се прикажани на график 4, каде што може да се забележи дека најголем дел од примероците се со голем процент на позитивност  $> 300 \%$ , додека негативни беа само 4 примероци.

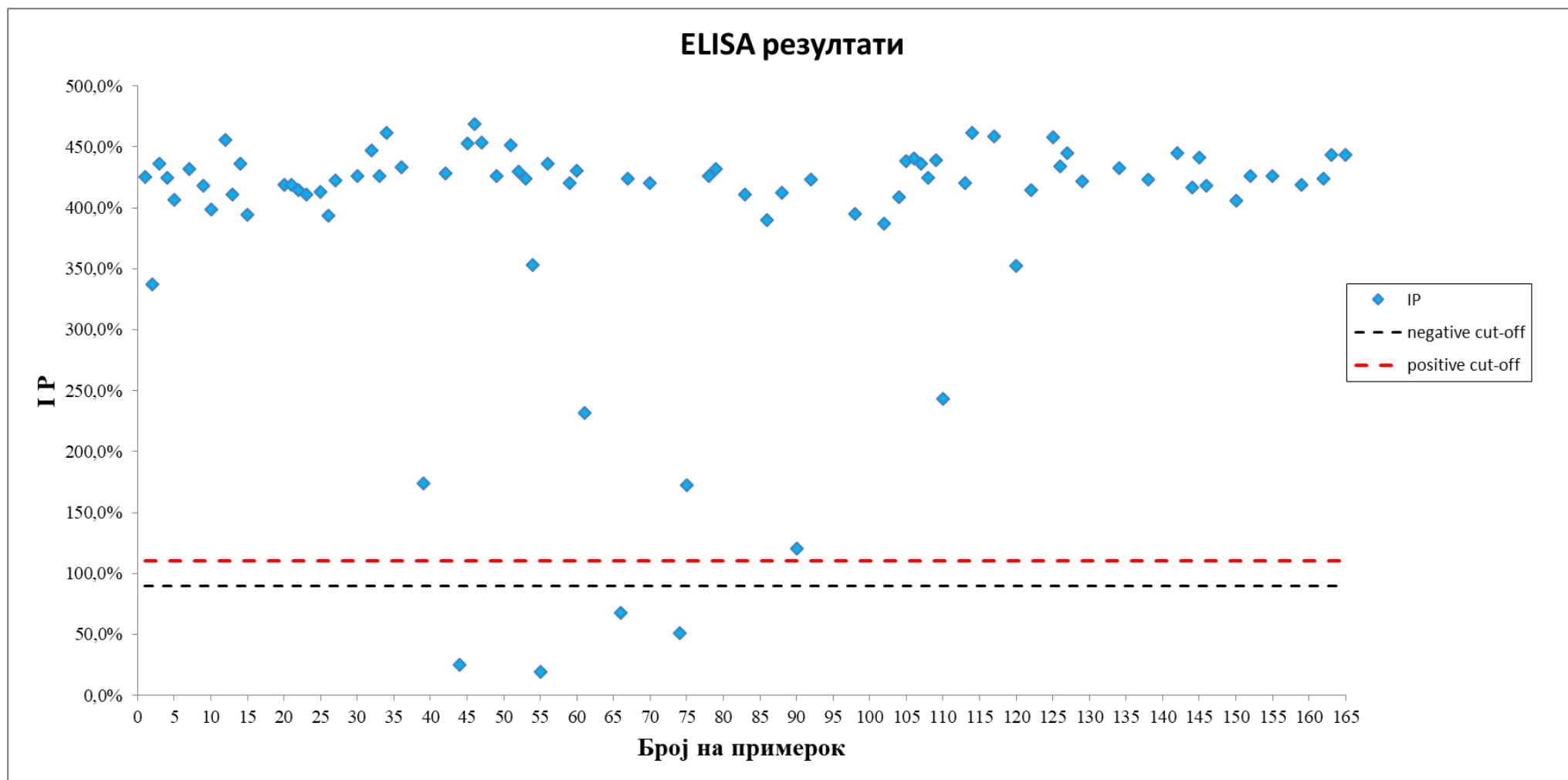


График. 4. Дистрибуција на резултатите добиени со ELISA-тестирањето

За инфицирани беа прогласени примероците кои дадоа позитивен резултат барем на еден серолошки тест. Сите 84 болни кучиња беа позитивни барем на еден од тестовите, додека 77 (91,67 %) од испитаните кучиња дадоа позитивен резултат на два серолошки теста.

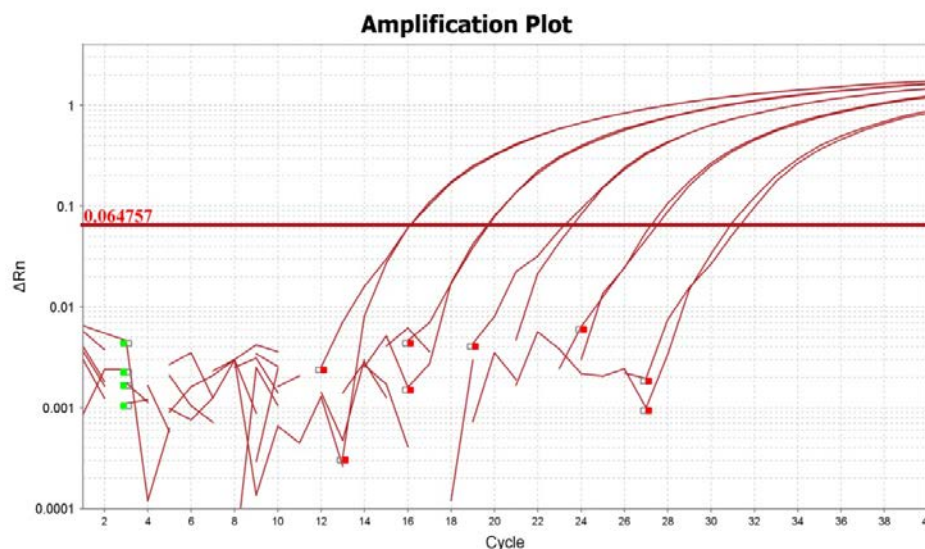
Од резултатите добиени со „Анализа на совпаѓање“ и Cohen’s Kappa Statistics, највисок степен на усогласување беше забележан помеѓу серолошките тестови на BioNote и Idexx (Cohen’s Kappa = 0,38) што влегува во категоријата на т.н. „поволна“ (fair) усогласеност, според Maggi и сор. (126) (табела 12).

Табела 12. Приказ на усогласеност на серолошките тестови

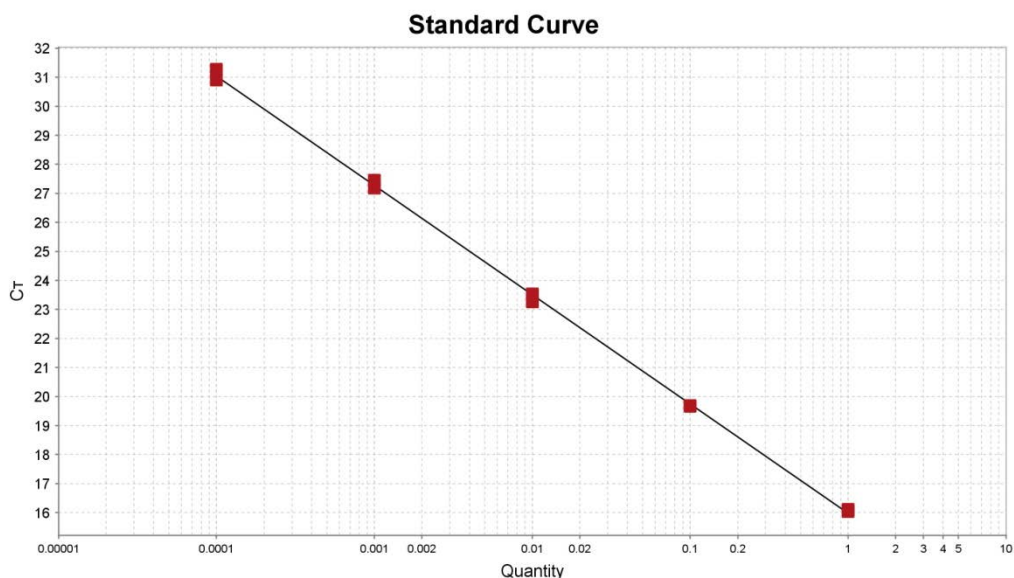
	Bionote/Idexx	Idexx/ELISA	Bionote/Elisa
Agreement% (CI95 %)	85 (75,26 - 92,00)	82,50 (72,38 - 90,09)	87,50 (78,21 - 93,84)
Kappa ± SE	0,38±0,11	0,12±0,11	0,10±0,11
$\chi^2$ (p)	12,47 (p < 0,01)	2,49 (0,11)	1,11 (0,29)

## 5.6. Молекуларна анализа и компарација на молекуларните и серолошките испитувања

Со методот qPCR беа испитани вкупно 122 примероци на полна крв, од кои 80 болни кучиња пред терапија и 42 по терапија. Од болните кучиња пред терапија, позитивни беа 36 или 45 %, додека qPCR по терапија не детектира ниту еден позитивен примерок.



Графикон 5. Амплификациска крива



Графикон 6. Стандардна крива qPCR

Slope	-3.77
R2	0.999
Efficiency (%)	84.3

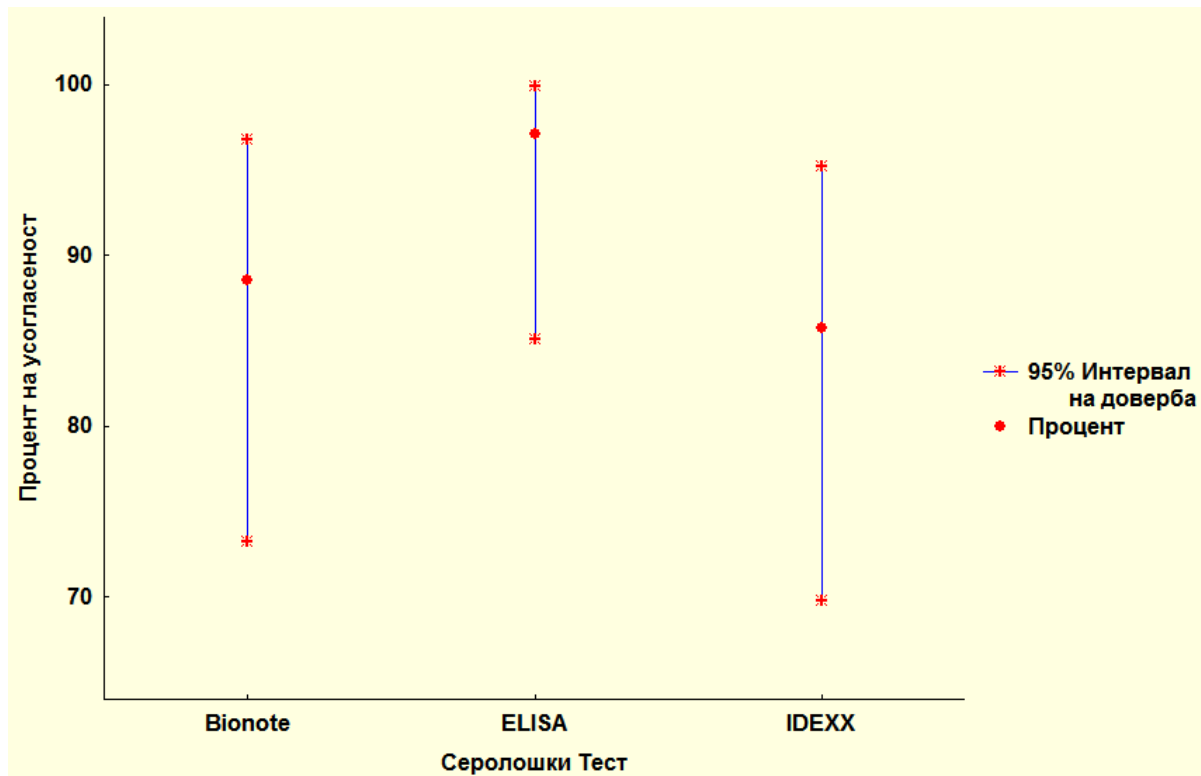
Добиените вредности за *slope*, коефициент на корелација R2 и ефикасност - E се во оптимални граници и потврдуваат дека протоколот е добро оптимизиран и функционира во широк опсег на концентрации.

### Компарација на серолошките со молекуларните тестови

Од спроведените анализи на резултатите од серолошките тестови со PCR-резултатите (како стандард за позитивни случаи) може да се забележи дека ELISA-тестот има најголема усогласеност на позитивните резултати. Ова е во солгасност со претходните анализи каде што се потврдува нивото на усогласеност помеѓу тестовите Idexx и BioNote. Сите анализи укажуваат на заклучокот дека тие тестови (Idexx и BioNote) се со значителна помала усогласеност во однос на ELISA-тестот во детекцијата на позитивните случаи (графикон 7).

Резултатите добиени при споредба на секој од серолошките тестови со PCR-методот, анализирани со Пирсонов хи-квадрат тест на независни варијабли, покажаа

дека ниту еден од серолошките тестови не е статистички значајно зависен од тестот на PCR, каде што се применети позитивните и негативните наоди (графикон 8).



Графикон 7. Усогласеност на позитивните резултати од qPCR и серолошките тестови

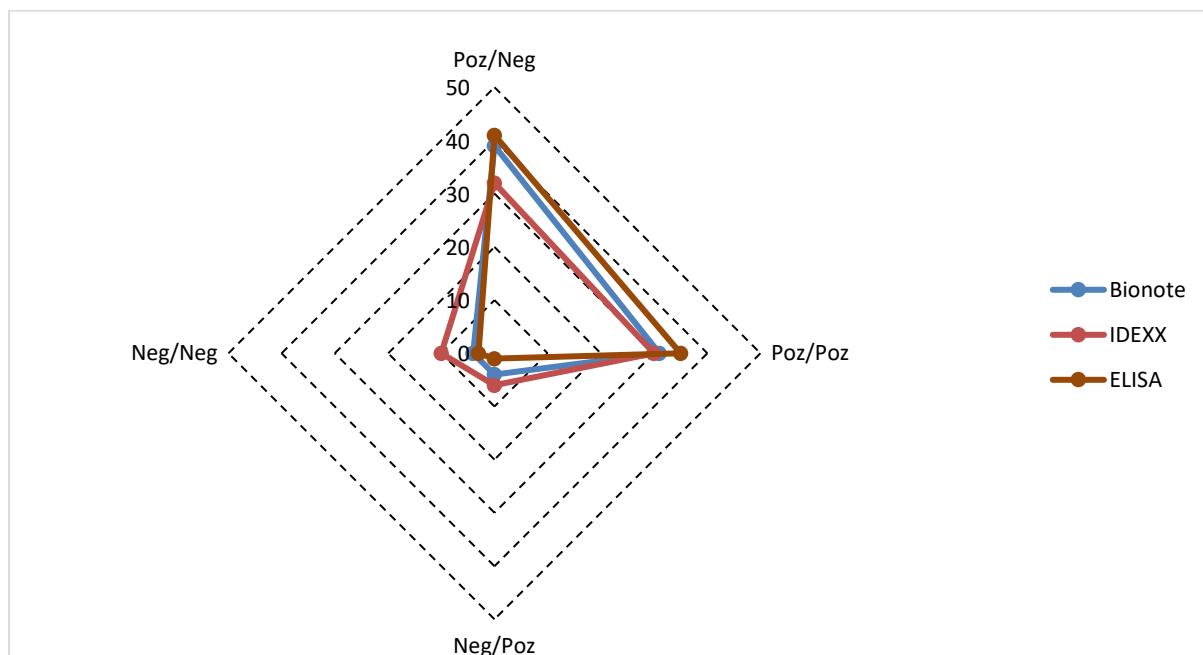


График 8. Споредба на резултатите добиени со qPCR и резултатите од серолошките тестови

## 5.7. Терапевтски протокол и ефикасност на терапијата

Следејќи го ефектот на терапевтскиот протокол, како и ефикасноста на дадената терапија, евидентирано беше комплетно повлекување на клиничките симптоми, со видно подобрување на хематолошките и биохемиските резултати. Кај сите кучиња кои беа контролирани по терапија, а претходно биле со позитивен наод на qPCR (n = 23), по терапијата дадоа негативен резултат, т.е. не беше детектирана DNK на причинителот во периферната циркулација (прилог PCR-резултати).

## 5.8. Коинфекција со *Leishmania infantum*

Сите болни кучиња (84) истовремено беа тестирани за присуство на *L. infantum* и вкупно 24 покажаа позитивен резултат (28,6 %). Резултати од хематолошките и биохемиските анализи се прикажани во прилог 2 и 3.

## 6. ДИСКУСИЈА

Бактеријата *Ehrlichia canis*, на европскиот континент ја пренесува кафениот крлеж *Rhipicephalus sanguineus* чија распространетост, поради климатските промени во последните години, се зголемува и е сè повеќе присутен речиси во цела Европа. Сите европски земји кои се простираат покрај Средоземното Море се ендемски за *E. canis*, а според објавените студии болеста е проширена и кон северните земји, како Швајцарија и Германија (18). Моноцитната ерлихиоза е заболување кај кучињата предизвикано од грам-негативната бактерија *E. canis*. Иако оваа болест е веќе опишана во соседните земји како на пр. Албанија, Србија, Бугарија и Грција (21, 22, 23, 24), во Р Македонија ова заболување е доста присутно, но сè уште недоволно истражено (25).

Моноцитната ерлихиоза кај кучињата, предизвикана од *E. canis* е мултисистемско заболување, опишана како најдобриот „имитатор“ меѓу инфективните болести. Може да се манифестира како метаболичко, невролошко, урогенитално, офталмолошко заболување, како заболување на црниот дроб, слезената или бубрегот (30, 127). Неспецифичните симптоми, заедно со недостатокот на стандардизирана прецизна дијагностичка процедура, се дел од причините кои ја отежнуваат дијагностиката на МЕК. Како најчести клинички знаци за моноцитната ерлихиоза кај кучињата се истакнуваат: депресија, летаргија, анорексија, треска, слабеење, лимфаденомегалија, спленомегалија, склоност кон крварења (петехии, ехимози и епистакса) (40).

*Ehrlichia canis*, како и останатите облигатни интрацелуларни бактерии, има способност да се размножува во клетката домаќин и со тоа да го избегне имунолошкиот систем. Ова е еден вид одбранбен механизам со кој се избегнуваат антителата, кои не можат да влезат во клетката домаќин (9). Инфекцијата со *E. canis* предизвикува создавање на специфични антитела, IgM и IgA кои се појавуваат околу 4. до 7. ден по инфекцијата, додека IgG антителата се јавуваат околу 15. ден по инфекцијата (81).

Еден од можните механизми за патолошките промени и појавата на клиничките знаци е дисфункцијата на имунолошкиот систем. Покачената телесна температура и поединечни други симптоми се смета дека се предизвикани од зголеменото создавање на интерлеукин-1 (IL-1) од заразените клетки и од Б-клетките или од егзогените пирогени продукти на бактеријата. Овие промени вообичаено настануваат за 10 - 14 дена од инфекцијата (128). Патохистолошките наоди на лимфоцитна, плазмоцитна и моноцитна инфилтрација во повеќе органи вклучувајќи ги ЦНС, очите, лимфните јазли, слезената, црниот дроб, бубрезите, мочниот меур, панкреасот, простатата, тестисите,

како и молекуларната детекција на DNK од *E. canis* во лимфните јазли, слезената, црниот дроб и бубрегот, одат во прилог на тоа дека болеста напаѓа различни органски системи на заболените животни, со што се објаснува и нејзиниот потенцијал за предизвикување на разновидни клинички знаци (42).

## 6.1 Клиничка манифестација на МЕК

Во тек на истражувањето на клиничките случаи на МЕК споредени со здравите кучиња, најчесто застапени клинички симптоми беа: зголемена телесна температура - пирексија, анорексија, слабост, бледи лигавици, лимфаденомегалија, епистакса. Како најчесто застапен клинички симптом беше евидентирана пирексијата (87,84 %), што се совпаѓа со резултатите објавени од Parashar и сор. (129) (95,65 %) и Sosa-Gutierrez и сор. (130) (91,2 %). За разлика од овие автори, во други истражувања пирексијата била забележана со помала застапеност од 17 % до 43,3 % (115, 131, 132). Втор по застапеност клинички симптом беше анорексија со 77,03 %, слично како и резултатите во истражувањата на Sosa-Gutierrez и сор. (130) (86,7 %), Nakaghi и сор. (132) (56,7 %), Parashar и сор. (129) (56,52 %), додека помалку застапена во истражувањето на Frank и сор. (131) (25-35 %). Кај 74,32 % од болните животни беше застапен симптомот на слабост/летаргија, додека бледи (анемични) лигавици беа забележани кај 56,76 % од болните животни, што е согласно со наодите објавени од други автори (115, 129, 130, 132). Соодветно на резултатите од истражувањата на Shipov и сор. (115) и Nakaghi и сор. (132), лимфаденомегалијата како клиничка манифестација во ова истражување беше забележана кај 47,3 % од болните кучиња. Епистаксата беше присутна кај 40,54 % од пациентите, во согласност со резултатите на Nakaghi и сор. (132) и Parashar и сор. (129), наспроти многу повисоката застапеност објавена од страна на Sosa-Gutierrez и сор. (130).

Статистички значителна разлика помеѓу подгрупите PCR+ и PCR- во однос на клиничката манифестација не беше забележана, за разлика од резултатите на Moonagmart и сор. (133), кои забележале сигнификантна разлика во однос на намалениот апетит. Намален апетит како клиничка манифестација во нашите резултати подеднакво беше застапен кај двете подгрупи. Во истражувањето на Parmar и сор. (91), кај сите PCR+ била застапена зголемена телесна температура (100 %), кај 52,5 % со бледило на лигавици и крварења кај 50 %, симптоми кои во нашето истражување имаа пониска застапеност (87,9 %, 45,4 % и 39,4 % соодветно).

Разликите во клиничките знаци може да се интерпретираат преку различните фактори кои влијаат како егзогени, каде би ги издвоиле разликите во патогеноста на различните соеви на *E. canis*, начинот на одгледување и исхрана на кучето и ендогени фактори како што се: расата на кучето, возраста, коинфекции со други векторски преносливи болести, имунолошкиот статус на кучето, постоење на некое друго системско заболување и слично.

Најзастапени клинички знаци (симптоми) кои може да насочат сомнеж кон МЕК се: пирексија, депресија, бледи лигавици, крварења во вид на епистакса или мелена (129). Застапеноста на клиничките знаци и самата клиничка манифестација на болеста е многу разновидна, пред сè поради можноста од различни стадиуми на болеста, вирулентноста на причинителот, како и можноста за коинфекции со други болести карактеристични за ендемското подрачје, различниот начин на земање податоци итн. Нискиот процент на застапеност на различните комбинации на симптоми (графикон бр. 3) во нашето истражување, соодветствува на разновидната клиничката манифестација на болеста, односно според добиените резултати не постои група на клинички симптоми кои се застапени во поголем процент од болните кучиња. Поради неспецифичноста на клиничките знаци, клиничката манифестација не е доволна информација за поставување на дијагноза за постоење на моноцитната ерлихиоза.

## **6.2. Промени на хематолошките параметри кај МЕК**

Најзастапени хематолошки нарушувања кај моноцитната ерлихиоза се тешка тромбоцитопенија, слаба, умерена до тешка анемија и леукопенија до леукоцитоза во различен степен. Тромбоцитопенијата е еден од најчесто присутните нарушувања кај повеќе од 80 % од случаите, без оглед на фазата на заболувањето, како и дали станува збор за природно или експериментално инфицирани животни (134). Сепак, неколку автори укажуваат на тоа дека моноцитната ерлихиоза не треба да биде отфрлена како дијагноза доколку е забележан нормален број на тромбоцити кај испитаните кучиња (18, 70). Хипоплазијата на коскената срцевина, често пати кај моноцитната ерлихиоза резултира со појава на нерегенеративна анемија, т.е. една од застапените хематолошки промени кај ова заболување. Се смета дека анемијата се јавува како резултат на губењето на крв, супресија на активноста на коскената срцевина и намалената еритропоеза, како и периферна екстравакуларна деструкција на еритроцитите (56, 129). Исто така, чест хематолошки наод се и леукопенија, неутропенија, лимфопенија или слаба

лимфоцитоза, додека панцитопенијата се смета за карактеристична појава кај хроничната фаза на болеста, особено во ендемски подрачја, иако тешко е да се направи разлика кај природно инфицираните кучиња (135, 136).

Помеѓу групата болни животни и контролната група, сигнификантни разлики беа забележани кај следниве параметри: бројот на црвените крвни клетки, хематокритот, хемоглобинот, тромбоцитите и еозинофилите. Разлики беа забележани во основните параметри на хемограмот, како што се: бројот на еритроцитите, вредноста на хематокритот и концентрацијата на хемоглобинот кај болните животни кои имаа пониски вредности во однос на групата здрави животни, што е во согласност со податоците во повеќе научни трудови (129, 133, 137, 115, 138).

Кај групата болни животни, бројот на тромбоцитите беше понизок во однос на контролната група, што е и најчестиот наод кај моноцитната ерлихиоза во согласност со повеќе автори (129, 115, 138, 133). Тромбоцитопенијата беше застапена во 95,24 % од болните кучиња, слично со наодите на Sosa-Gutierrez и сор. (130), во чие истражување тромбоцитопенијата била застапена со 93,8 %, додека кај Shipov и сор. (115) била со максимални 100 %. Трошењето на тромбоцитите, зголемената секвестрација во слезената и намалениот период на преживување се можните причини за честата тромбоцитопенија кај моноцитната ерлихиоза. Намалената синтеза на протеините за коагулација во црниот дроб, заради некроза на хепатоцитите може исто така да предизвика зголемена агрегација на тромбоцитите, што придонесува за појава на тромбоцитопенија. Тромбоцитопенијата, главно заради големата деструкција на тромбоцитите во слезената, започнува неколку дена по инфекцијата и заедно со привремената хипоплазија на коскената срцевина се примарните причинители на панцитопенијата (137, 56). Иако во литературата се опишани повеќе фактори кои придонесуваат за тромбоцитопенија, сепак како основен фактор се смета зголемувањето на бројот на антитела против тромбоцитите, што понатаму доведува до намалување на полуживотот на тромбоцитите во циркулацијата, предизвикувајќи акутно уништување на тромбоцитите и тромбоцитопенија. Ова се манифестира и преку клиничките знаци како внатрешни и надворешни спонтани крварења, иктерус, асцитес (129).

Промените на леукограмот кои настанува кај инфекција со *E. canis* може да бидат разновидни, особено кога се работи за акутна фаза на болеста. Леукопенијата е често застапен наод, особено во хроничната фаза на болеста, заради супресија на коскената срцевина, како и можноста некои од моноцитите инфицирани со *E. canis* да се адхерираат на ендотелот од крвните садови, што доведува до намалување на нивниот

број (139). Леукопенијата во нашето истражување беше застапена со мал процент, од само 20,24 %. Овој наод, како и застапеноста на неутропенијата, моноцитопенијата, еозинопенијата (21,4 %, 7,14 % и 15,5 % соодветно) се пониски од вредностите добиени во истражувањето на Tsachev и сор. (134), кај природно инфицирани кучиња каде што неутропенијата била застапена со 25,80 %, моноцитопенијата 67,74 % и еозинопенијата кај 77,41 % примероци, соодветно.

Поголем дел од болните кучиња (64,3 %) беа без промени на лимфоцитите, кај 25 % од болните кучиња имаше лимфопенија додека лимфоцитоза беше забележана кај 10,7 % од испитаните животни, што се совпаѓа со податоците од литературата каде што лимфоцитопенијата е застапена во проценти од 6,45 до 46 % (131, 134). Кај групата болни животни бројот на еозинофилите беше понизок во однос на групата здрави животни, согласно наодите на Moonarmart и сор. (133), de Castro и сор. (41) и Tsachev и сор. (134) кои во своите истражувања забележале појава на еозинопенија кај кучињата заболени од моноцитна ерлихиоза. Наспроти ова, во истражувањето на Kottadamane и сор. (138), била забележана појава на еозинофилија кај кучињата заболени од ерлихиоза. Намалувањето на бројот на еозинофилите може да настане како резултат на паразитолошка инфестација со хемофагни крлежи, акутна инфекција или имунолошка супресија на организмот.

Нерегенеративна анемија во различен степен, тешка тромбоцитопенија и слабата леукопенија, се општо прифатените три кардинални хематолошки карактеристики за акутната и субакутната ерлихиоза (129). Покрај ова, од добиените резултати во однос на хематолошките промени кај кучињата со моноцитна ерлихиоза, може да се заклучи дека најзастапена промена во нашето истражување беа тромбоцитопенијата и анемијата, додека леукопенијата не е секогаш застапена и зависи пред сè од фазата и интензитетот на болеста, како и степенот на вирулентност на причинителот.

Постоењето на статистички значајна разлика помеѓу подгрупата PCR+ и PCR- во однос на лимфоцитите може да се објасни со фактот дека кај кучињата од групата PCR+ причинителот е присутен во доволна концентрација (докажана со позитивен резултат на PCR) да предизвика посилна имунолошка реакција. Според податоците од литературата, лимфопенијата е повеќе застапен наод во акутна фаза на болеста и укажува на рана фаза од инфекција, кога организмот е во фаза на бактериемија.

Статистички значителна разлика беше забележана во однос на моноцитите, при што кај подгрупата PCR- беа со пониска вредност во однос на подгрупата PCR+. Како промени, моноцитозата и моноцитопенијата се објавени во студии за акутна ерлихиоза

(135). Овој наод е спротивен од истражувањето на Моонаmart и сор. (133) кои објавиле статистички значајни разлики во бројот на белите крвни клетки, еозинофили, но не нашле разлика кај моноцитите, лимфоцитите и неутрофилите кај PCR+ и PCR– група. Инфицираните животни покажале значително покачување на неутрофилите и моноцитите во 3 недела од инфекцијата, додека бројот на лимфоцитите значително се намалил (133). Во нашиот случај бројот на моноцитите беше повисок кај PCR+ група. Повисокиот број на моноцити во групата PCR+, значи состојба на перзистентна бактериемија со преминување во хронична фаза и континуиран имунолошки стимул. Синтезата на проинфламаторните цитокини ја стимулира моноцитната лоза, во миелопоезата во коскената срцевина

Статистички значајна разлика кај кучињата пред и по завршување на терапијата беше забележана кај вредностите за бројот на еритроцитите, хематокритот, хемоглобинот и бројот на тромбоцитите. Во истражувањето на Villaescusa и сор. (140), терапијата со доксициклин кај кучињата со моноцитна ерлихиоза резултирала со зголемување на бројот на еритроцити и тромбоцити кои на крај од третманот се вратиле во граници на референтните вредности, за што авторите сметаат дека бројот на еритроцитите може да се користи како добар прогностички податок (113). Слични резултати се добиени и во истражувањето на McClure и сор. (98) кои забележале враќање на вредностите на хематокритот, тромбоцитите и леукоцитите во граници на референтните вредности кај испитаните животни по завршување на терапијата.

Статистички значајни резултати забележавме во вредностите на бројот на еритроцитите и хемоглобинот, кои во групата болни животни по терапија беа пониски во споредба со здравите животни, додека вкупниот број на еозинофилите не покажаа значителни отстапување помеѓу групата болни животни по терапија и групата здрави животни. Бројот на тромбоцитите и бројот на еритроцитите обично за брзо време се враќаат во граница на референтната вредност (во тек на првата недела од терапијата), но можна е задоцнета реакција и одговор дури и по 30 дена од терапијата, најчесто заради хипоплазија или аплазија на коскената срцевина (98, 113).

### **6.3. Промени на биохемиските параметри на серумот кај МЕК**

Најчесто застапени промени на биохемиските кај МЕК се хипоалбуминемија, хиперглобулинемија и хипергамаглобулинемија, потоа умерено зголемување на нивото на аланин аминотрансфераза и алкалната фосфатаза (40). Статистички значителна

разлика во биохемиските параметри помеѓу групите болни и здрави животни забележавме во однос на: албумините (ALB), вкупните протеини (TP) и алкалната фосфатаза (ALKP). Нивото на албумините и вкупните протеини во групата болни животни беше пониско во однос на групата здрави животни. Хипоалбуминемијата кај групата болни животни беше присутна во 79,5 % од случаите, што се совпаѓа со резултатите на Frank и сор. (1999) каде што изнесувала 70 %. Спротивно од нашите резултати објавиле Harrus и сор. (35) и Mylonakis и сор. (95), каде што застапеноста на хипоалбуминемија била 29 %, односно 35 %. Како причина за појава на хипоалбуминемијата, како и намалено ниво на вкупните протеини, се наведуваат инсуфициенцијата на црниот дроб, со намалување на синтезата на албумините, нефропатија проследена со губиток на протеини, гастроинтестинални нарушувања, васкулитис и хиперглобулинемија (131).

Нивото на алкалната фосфатаза кај групата болни животни беше значително повисоко во однос на здравите кај 63,1 %, што е приближно два пати повисока од вредноста објавена во истражувањето на Mylonakis и сор. (95), а слична со резултатите на Harrus и сор. (35), каде нивото на алкалната фосфатаза била повисока кај 56 % од болните животни. Високите вредности за алкалната фосфатаза во нашето истражување кај групата болни животни во однос на група здрави животни, соодветствува со наодите на Rungsiapat и сор. (137), Harrus и сор. (35) и Frank и сор. (131), а како причини за нејзино зголемување најчесто се наведуваат бројни оштетување на црниот дроб, патолошки промени на мускулниот и коскениот систем, каде што овој ензим најмногу го има, како и при хиперадреноркортицизам или евентуална долготрајна апликација на глукокортикоиди, како и при состојба на пирексија.

Хипоалбуминемија и покачување на вредностите на алкалната фосфатаза се најчестиот наод од биохемиската анализа на серумот во истражувањето на Kottadamane и сор. (138) и Frank и сор. (131). Црниот дроб е орган кој е често променет кај кучиња со моноцитна ерлихиоза, што се докажува со покачување на специфичните ензими на црниот дроб (AST, ALT), дифузна централобуларна дегенерација, хроничен активен хепатитис, хипопротеинемија, хипоалбуминемија и зголемување на алкалната фосфатаза (137).

Хиперглобулинемијата која беше забележана при анализа на добиените вредности помеѓу групата болни животни и групата болни животни по терапија, покажа незначително отстапување во однос на добиените вредности во истражувањата на Frank и сор. (131) и Harrus и сор. (35). Корелација помеѓу хиперглобулинемијата и

зголемување на концентрацијата на алкалната фосфатаза кај серопозитивните кучиња е објавена и во истражувањата на Akhtardanesh и сор. (141) и Kottadamane и сор. (138).

Најчесто застапени промени при биохемиската анализа на серумот се нивото на албумините и вкупните протеини, како и алкалната фосфатаза, што најверојатно е како резултат на оштетувањето на црниот дроб кое го предизвикува оваа бактерија. Ова настанува поради антигениот потенцијал на бактеријата, која во Купферовите клетки на црниот дроб, како дел од моноцитно-макрофагниот систем, предизвикува имунолошко престојување, кое пак резултира со промени на васкуларниот систем преку биогените амини и на тој начин директно влијае врз метаболизмот на хепатоцитите, нарушувајќи го пермеабилитетот и акцискиот потенцијал на клеточната мембрана, па цитосолните ензими излегуваат во циркулацијата.

Анализирајќи ја концентрацијата на Ц-реактивниот протеин, како одговор на воспалителната реакција, Mylonakis и сор. (70) заклучиле дека CRP е значително повисоко кај кучиња со тешка миелосупресија, за разлика од оние со некомплицирана моноцитна ерлихиоза. Наспроти нив, во нашето истражување не беа забележани статистички значителни разлики помеѓу групите болни и здрави животни, помеѓу подгрупите кај кучињата пред и по терапија, како и групата животни по терапија и здравите животни. Тоа значи дека иницијацијата за синтеза на овој позитивен протеин на акутна фаза на инфламација е стимулиран од неспецифичен причинител. Непостоењето на статистички значителната разликата на овој протеин во целокупната популација на анализирани кучиња, наведува на широкиот дијапазон на неспецифични фактори кои доведуваат до негова синтеза. Ерлихиозата не предизвикува специфично зголемување на серумската концентрација на Ц-реактивниот протеин, а тоа е поради интерференција на регулаторните имуногени механизми. Покрај Ц-реактивниот протеин, зголемена концентрација е забележана и кај SAA и Hp кај природно инфицирани кучиња, меѓутоа авторите сметале дека немаат прогностичко значење за конечниот клинички резултат (70).

Некои од протеините на акутна фаза може значително да ја променат својата концентрација за време на акутната моноцитна ерлихиоза, но сепак имаат ограничено клиничко значење за проценка на ефикасноста на терапијата и интензитетот на болеста. Во однос на кинетиката, концентрацијата на CRP е со тенденција на постепено намалување на онаа вредност како пред изложување на инфектот, за време од 4 до 6 недели по инфекцијата (142). Црниот дроб е главен орган, одговорен за синтеза на протеините на акутна фаза, додека интерлеукин 6 е одговорниот цитокин кој ја индуцира

продукцијата на CRP во црниот дроб. Оштетувањето на црниот дроб што го предизвикува ерлихиата може да е една од причините за добивање пониски вредности.

#### 6.4. Серолошка дијагностика

Комерцијално достапните брзи тестови се најчесто користени да докажување на присуството на антитела IgG за *E. canis* бидејќи се лесни за изведување, не бараат дополнителна опрема, времето на читање резултати е доста брзо, наспроти пософистицираните методи IFAT и ELISA, за кои е потребна соодветна опрема и аналитичари, како и време за добивање на резултат. Антителата за ерлихиа се создаваат околу 7 - 35 дена по инфекцијата и не се во корелација со моменталната состојба, времетраењето на инфекцијата или присуството и тежината на клиничката манифестација (143). Задоцнетата појава на антитела во циркулацијата, кај инфицираните кучиња во акутна фаза, може да резултира со лажно негативен резултат кај акутно болните кучиња, и покрај присутните клинички симптоми и хематолошки промени.

Во неколку истражувања објавено е дека IgM и IgG-антителата не се детектабилни од 1 до 3 недели по инфекцијата (81, 144). Исто така заради постоење на супклиничка фаза на болеста, која може да трае подолго време, како и долготрајната серопозитивност по завршување на терапијата и ерадикација на причинителот, треба да се земе предвид дека серопозитивно куче, особено доколку станува збор за ендемско подрачје, не значи и болно куче (143). Титарот на антитела останува позитивен за време од 3 до 9 месеци по терапијата, со можност за пролонгирање до 31 месец (145).

Комерцијално достапни се голем број брзи дијагностички тестови за тестирање на антитела за *E. canis*. Обично овие тестови се верифицирани да покажат позитивна реакција кога нивото на антитела одговара на IFAT титар минимум 1:320 (143). Кај природно инфицирани кучиња речиси е невозможно да се направи јасна разлика помеѓу акутната и хроничната фаза на болеста, како што веќе е истакнато од Frank и сор. (131), затоа и во ова истражување не е направена таква поделба. Со цел да се постави точна дијагноза за *E. canis* кај природно инфицирани кучиња, особено ако се работи за хронична фаза на болеста, кога бактеријата е слабо присутна во периферната циркулација, најсоодветно е да се изврши серолошко тестирање (132, 146). Кинетиката на антителата е доста непредвидлива, често пати перзистираат во циркулацијата неколку месеци до години по ерадикација на ерлихијата од организмот, што ја ограничува

употребата на серологијата, како метод на следење на успешноста на терапијата, но и како дијагностички метод.

Од вкупно 84 кучиња за кои беше поставен сомнеж за МЕК, позитивен резултат на серолошките тестови на BioNote, Idexx и ELISA беше присутен кај 90,2 %, 80,5 % и 96,4 % соодветно. Сите болни кучиња беа позитивни барем на еден од тестовите. Овие наоди се слични со серолошките испитувања направени од Oliveira и сор. (152) и Sosa-Gutierrez и сор. (130) со 92,3 % и 74,5 % соодветно, наодите на Parmar и сор. (91) кои објавиле серопозитивност кај само 52,5 % од сомнителните кучиња, што најверојатно се должи на раната фаза на инфекција, пред создавање на доволна количина на антитела кои тестот може да ги детектира (91, 130, 147).

Анализирајќи ги резултатите од серолошките тестови, т.н. „поволна“ (fair) усогласеност беше добиена помеѓу тестовите на *BioNote* и *Idexx*, согласно *Cohen's Kappa* индексот која дополнително беше потврдена со добивање на статистичка значајност за Пирсонов хи-квадрат тест ( $p < 0,01$ ). Наспроти нив, значително пониска усогласеност беше добиена помеѓу ELISA и брзите тестови. Висока усогласеност ( $\kappa = 0,97$ ) на Snap 4dx (idexx) со методот IFAT е добиено во истражувањата на на Stillman и сор. (79) и Chandrashekar и сор. (80).

Во својата студијата Nagus и сор. (78) не забележале значителна разлика при споредувањето на неколку серолошки тестови, при што ја истакнале само предноста на ELISA и IFAT во поглед на можноста да се добијат квантитативни резултати за разлика од брзите тестови. Квантитативните резултати можат да помогнат во интерпретацијата на резултатите во однос на изложеност на причинителот наспроти активно заболување, истакнувајќи дека четирикратно зголемување на титарот на антитела означува постоење на активна болест (43). Клинички здравите кучиња во супклиничката фаза на болеста се носители на бактеријата и може да ја носат со години, без да се развие хроничната фаза од болеста, а во поединечни случаи, според Nagus и сор. (100), може да дојде до елиминација на бактеријата и спонтано оздравување без спроведување на терапијата. Истите автори сметаат дека со користење на PCR-методот може да се определи дали серопозитивното куче е носител/преносител на причинителот (54).

## 6.5. Молекуларна дијагностика

Молекуларната дијагностика со помош на PCR е високо сензитивен метод за рана детекција (4 - 10 дена по инокулација), молекуларна карактеризација и квантификација

на микроорганизмите (143). Сензитивноста на PCR-методот е голема и може да детектира DNK на *E. canis* до еквивалент на бактериемија на еден инфициран моноцит во  $10^{36}$  клетки и нема можност за грешки заради вкрстени реакции (132). Со помош на овој метод се надминуваат проблемите на прекумерната детекција или лажно негативните резултати кои се честа појава кај серолошките методи поради рана инфекција, а дополнително молекуларната дијагностика има голема улога во прогнозата и може да се користи како сигурен показател на ефикасноста на спроведената терапија (91).

За детекција на *E. canis* кај болните кучиња, како и за контрола на успешноста на терапијата, во нашето истражување се користеше методот на qPCR. Водејќи се според податоците од литературата, полната крв е добар примерок за докажување на DNK од *E. canis*, додека qPCR е сензитивен, специфичен и веродостоен метод за детекција на ерлихија во крв од кучиња (17, 144, 147). Токму заради тоа, во нашето истражување како примероци за детекција на причинителот користевме полна крв, пред сè заради неинвазивноста, како и минималниот стрес кај животното при добивање на материјал за испитување.

Од 80 серопозитивни кучиња, со помош на qPCR беше докажано присуството на DNK на *E. canis* кај 36, односно 45 % од кучињата. Во истражувањето на Maazi и сор. (14), кај само 22,5 % од серопозитивните кучиња детектирале DNK од *E. canis*. Можна причина за ваквиот наод е начинот на одбирање на примероците, имено во истражувањето на Maazi и сор. (14), примероците се случајно одбирани, додека во нашето истражување вклучени беа примероци од кучиња со клинички изразени симптоми. Во истражувањето на Parma и сор. (91), каде примероците за анализа се селектирани врз основа на клиничка манифестација на болеста, објавиле сличен резултат од 38,09 %. За разлика од ова истражување, Sousa и сор. (148) објавиле значително повисок процент од 70 % позитивни примероци, при тестирање на серопозитивните примероци со методот PCR, каде како примероци за анализа се користени делови од слезена. Можна причина за високиот процент на PCR-позитивни примероци во истражувањето на Sousa и сор. (148) е повлекување на бактеријата во моноцитно-макрофагниот систем на слезената.

Во нашето истражување, резултатите од извршените анализи покажаа дека серолошкиот тест ELISA има најголема усогласеност на позитивните резултати со позитивните PCR-резултати (97,14 %). Висока усогласеност забележавме и од добиените резултати при примена на тестовите од *Idexx* и *BioNote*, но споредувајќи ги позитивните

резултати од серолошките тестови со позитивните резултати од qPCR, дојдовме до заклучок дека овие тестови се со значителна помала усогласеност во однос на ELISA-тестот при детекцијата на позитивните примероци. Што се однесува до анализата на добиените позитивни и негативни резултати, ниту еден од серолошките тестови не е усогласен со qPCR-методот, односно постои неусогласеност на негативните резултати помеѓу серолошките тестови и PCR.

Како можни објаснувања за разликата во резултатите добиени со серолошката и молекуларната анализа на примероците се наведуваат пред сè претходната изложеност на бактеријата, можна вкрстена реакција со *E. chaffeensis* или *E. ewingii* (во Македонија до сега не е забележано присуство на овие бактерии/паразити и нивните вектори) или детекција на антитела, кога нивото на ерлихија во циркулацијата е под детектибилното ниво на PCR, особено за време на хроничната фаза на болеста, како и при изразена апластична панцитопенија, како и способност на микроорганизмот да се „сокрие“ во макрофагите на слезената (14, 91, 148). Бидејќи сите 84 кучиња беа клинички болни во моментот на спроведениот преглед, со лабораториски резултати кои соодветствуваат на моноцитна ерлихиоза, позитивниот серолошки наод би бил индикативен за потврда за постоење на МЕК кај овие кучиња. Сепак, релативно нискиот процент на qPCR позитивни примероци, како и неспецифичноста на клиничкото наод, сугерира можност за висока застапеност на ерлихијата на територијата од која потекнуваат примероците. Оттука, истражувањето ја потврдува потребата од иницирање на широк, национален мониторинг за географската застапеност на инфекцијата со *E. canis*.

Серологијата и методот на PCR се најсоодветните тестови за потврда на постоење на болеста, но тие треба да се користат како комплементарни алатки на клиничката и хематолошката анализа. За најдобра интерпретација на резултатите, неопходно е да се знае фазата на болеста и ограничувањата на овие тестови. Предноста на методот на PCR во однос на серологијата е можноста за рана детекција на ДНК на ерлихија. Сепак, голем број серолошки позитивни и PCR-негативни примероци укажува на тоа дека серологијата е соодветен тест за дијагностика на природни инфекции со ерлихија кај кучињата, особено во хроничната фаза, кога *E. canis* е слабо застапена во периферната циркулацијата. Се смета дека серолошки позитивните и PCR-негативни животни најверојатно се во хронична фаза на болеста, кога бројот на клетките е редуциран поради оштетување на коскената срцевина, додека *E. canis* е локализирана во ткивото и затоа не може да се детектира ДНК на причинителот во периферна циркулација (132, 95). Бидејќи времето на трансмисија на *E. canis* кај природни инфекции е непознато, тешко

може да се направи разлика помеѓу акутна, субакутна или хронична фаза (128). Сепак, се смета дека серопозитивните кучиња, со би- или панцитопенија настаната поради хипоплазија на коскената срцевина се доволен дијагностички критериум за хронична фаза на болеста (23). Во нашиов случај кај 13 (15,48 %) кучиња беше забележана панцитопенија и дури 8 (61,54 %) од нив биле PCR-негативни. Друга можност за серопозитивен, а PCR-негативен наод е акутна инфекција со причинител кој дава слична клиничка манифестација, кај животни кои претходно биле инфицирани со *E. canis*.

Дијагностиката на кучешката ерлихиоза е доста комплексна и истата треба да се спроведе врз основа на анамнезата, клиничките знаци и резултатите од лабораториските анализи. Коинфекции со други патогени организми, кои се пренесуваат преку крлежот може да влијаат врз клиничките знаци и лабораториските наоди, а со тоа и ја усложнуваат самата дијагностика (40). Во ситуација на постоење специфични клинички знаци и позитивен PCR-наод, дефинитивна дијагноза може да се постави недвосмислено. Меѓутоа, останатите комбинации треба да се интерпретираат внимателно, земајќи ги предвид сите погоре изнесени аргументи.

Од добиените резултати во нашето истражување, најсоодветен дијагностички пристап кај клинички болните кучиња сомнителни за МЕК претставуваат деталната анамнеза и клиничкиот преглед придружени со дополнителна лабораториска анализа (со особен акцент на RBC, HCT, HGB, PLT, од хематолошките и ALB, TP и ALKP од биохемиските параметри), потоа серолошкото докажување на антитела и докажувањето на DNK со PCR-методот доколку постојат јасни индикации за акутна фаза на болеста за 100 % докажување на причинителот. Сепак, препорачливо е да се направи тестирање и за другите векторски преносливизаболувања кои се присутни на територијата на Р Македонија, кои даваат слична клиничка слика и лабораториски резултати, како кучешката лајшманиоза за која терапевтскиот протокол е сосема различен.

## 6.6. Терапија

Најчесто користен антибиотик за терапирање на моноцитната ерлихиоза е *доксциклин*, кој претставува полусинтетски тетрациклин. Во литературата постојат разновидни податоци за времетраењето и успешноста на терапијата на моноцитната ерлихиоза со антибиотикот *доксциклин*. Водејќи се според успешноста на протколот предложен од страна на Neer и сор. (114), со доксициклин во доза од 10 mg/kg/24 h, во тек на 28 дена, а успешноста на терапијата, покрај видното подобрување на клиничките

симптоми, како и коригирање на хематолошките и биохемиските параметри, беше дополнително потврдена со негативен наод со PCR кај сите кучиња од групата по терапија.

При контрола на ефектот од терапијата со *доксциклин*, забележано е прогресивно зголемување на концентрацијата на тромбоцитите, МСН и МНС кај кучиња со моноцитна ерлихиоза и кај здрави кучиња. Овие резултати укажуваат на специфичниот ефект на *доксциклинот* врз пролиферацијата на тромбоцитите и на еутироидните клетки, како и на концентрацијата на хемоглобинот на единца еритроцит (140).

Iqbal и Rikihisa (101) направиле реизолација на *E. canis* кај 3 од вкупно 5 кучиња, експериментално инфицирани во супклиничка фаза на болеста, коишто биле терапирани 7 дена со *доксциклин* 10mg/kg/ден. Во истражувањата на Schaefer и сор. (104) и McClure и сор. (98), кај експериментално инфицирани кучиња, со користење на горенаведениот терапевтски протокол, објавиле целосна елиминација на *E. canis* во акутна и супклиничка фаза на болеста која ја потврдиле со помош на PCR-методот, но според McClure и сор. (98) немало успешност на терапевтскиот протокол кај хронична инфекција, каде што повремено се добивале позитивни PCR-резултати по терапјата. McClure и сор. (98) исто така укажуваат на можноста крлежите да се инфицираат со *E. canis* од клинички здрави кучиња кои го имаат инфектот во периферна циркулација, што ја истакнува потребата од терапирање на кучињата уште во супклиничка фаза на болеста. Спротивно на ова, Harrus и сор. (100) објавиле позитивен PCR-наод кај експериментално инфицирано куче во супклиничка фаза на болеста и покрај 6-неделен третман со *доксциклин*, додека Fourie и сор. (99) објавиле резултати каде што е забележана ремисија на болеста кај дел од кучињата.

Во истражувањето на McClure и сор. (98), кај експериментално предизвикана моноцитна ерлихиоза, ја потврдиле ефикасноста на терапијата со *доксциклин* за време на акутната фаза на болеста, преку елиминација на клиничките симптоми, подобрување на хематолошките параметри како и негативен PCR-резултат во крвта по завршување на терапијата, додека кај хроничните случаи покрај подобрување на клиничката слика и хематолошките параметри, сè уште некои од кучињата дале позитивни резултати на PCR-методот (98). Ефикасноста на терапијата со *доксциклин* во акутна и хронична фаза ја потврдиле и истражувањата на Harrus и сор. (43) и Schaefer и сор. (104).

Успешноста на терапевтскиот протокол го следевме преку отсуството на клиничките симптоми, корекција на лабораториските параметри (коригирање на

анемијата, тромбоцитопенијата, враќање на албумините, вкупните протеини и алкалната фосфатаза во границите на референтните вредности) и PCR-детекција на DNK на *E. canis*. Од вкупно 84 болни кучиња, вклучени во истражувањето, 43 кучиња беа анализирани по завршување на терапијата. Видно клиничко подобрување, како и постоење на значителната разлика помеѓу болните кучиња и кучињата по терапија во однос на лабораториските параметри (RBC, HCT, HGB, PLT, ALKP и ALB) и 100 % негативен резултат на PCR се доволни параметри за да се каже дека терапевтскиот протокол покажа успешност во ова истражување.

Кога станува збор за моноцитна ерлихиоза, од особена важност е следење на пациентите по завршување на терапијата. Акутно инфицираните кучиња, за разлика од хроничните, вообичаено клинички се подобруваат за 24 - 48 часа од започнување на терапијата, додека закрепнувањето на хематолошките вредности се случува за време од 1 до 3 недели (139, 71, 73). Доколку кучето не изреагира на терапијата во горенаведениот период, можеби клиничарот е потребно да размисли за точноста на дијагнозата или некомплетната дијагностика (коинфекции). Иако, често пати може да дојде до значително подобрување на клиничките симптоми и хематолошките анализи предвремено т.е. пред целосната елиминација на бактеријата, терапијата не треба да биде прекината базирајќи се на дадените параметри (73). Повторната појава на тромбоцитопенија за 2 - 4 недели од прекинување на терапијата, означува неуспешна терапија или реинфекција (83).

Кинетиката на IgG-антителата е непредвидлива и често перзистираат неколку месеци до години по ерадикација на бактеријата, со што се отфрла можноста за следење на успешноста на терапијата со серолошките тестови (70,71, 92, 83). Според податоците од литературата и согласно нашите наоди, најсоодветен доказ за успешноста на трапијата е со методот на PCR од полна крв, 4 - 8 недели од третманот (9, 35, 71). Прогнозата е добра кај кучиња во акутна или супклиничка инфекција, без дополнителни коинфекции, додека присуството на панцитопенија со јака анемија, леукопенија или неутропенија, се знаци на лоша прогноза (142, 143).

Во однос на застапеноста на болеста зависно од возраста на кучињата, во ова истражување со вкупно 79,5 % беа застапени кучиња на возраст од 1 до 8 год., слично со истражувањето на Kottadamane и сор. (138) кои објавиле највисока преваленција кај кучиња на возраст од 1 до 3 години, како и Asgarali и сор. (149), каде што процентот на заболени адултни кучиња изнесувал 59,7 %. Причината за сигнификантна разлика на

серопозитивни кучиња постари од една година е поради тоа што веројатноста за стекнување на инфекција се зголемува со годините.

Што се однесува до податоците за превентивата, забележавме статистички значителна разлика ( $p < 0,01$ ) со Фишер-тестот помеѓу контролната група и група болни кучиња со апликација на репеленти против ектопаразити. Покрај обидите за пронаоѓање на вакцина против *E. canis*, за сега најефикасна превентива за моноцитната ерлихиоза претставува редовно користење на репелентни средства кои го убиваат и одбиваат кафениот крлеж *R. sanguineus* (122, 120). Parmar и сор. (91) објавиле дека кај 50 % од болните кучиња било забележано присуство на крлежи поради немање соодветна заштита, додека кај Frank и сор. (131) било забележано присуство на крлежи кај само 10 % од болните кучиња.

## 6.7. Коинфекција со Лајшманија

Кучешката лајшманија е векторски пренослива болест која ја предизвикува протозоа од родот *Leishmania*, *L. infantum*. Инфекцијата не секогаш предизвикува клиничка манифестација поради високата преваленција на супклиничка инфекција (150). Поновите истражувања ја отфрлаат можноста за евентуална вкрстена серолошка реакција на ерлихија со лајшманија (75, 151, 152). Во области каде што постојат повеќе вектор-преносливи болести, многу голема е веројатноста за појава на коинфекции. На територијата на Р Македонија објавено е присуството на *L. infantum*, предизвикувач на кучешката лајшманијаза, чиј преносител е песочната мува (153), со што постојат реални можности за истовремено инфицирање на кучињата. Коинфекцијата со повеќе вектор-преносливи болести влијае врз сериозноста на хематолошките абнормалности кај кучињата и претставува предизвик во однос на терапевтскиот протокол кој треба да се приспособи за секој пациент поединечно. Причинителите на ерлихија и лајшманија се интрацелуларни патогени кои ги користат моноцито-макрофагните клетки како домаќини, се дисеминираат од кожата во слезената, црниот дроб и коскената срцевина (154). *L. infantum* може да го ослаби клеточниот и хуморалниот одговор кај домаќинот, што може да влијае со појавување или реактивација на претходно постоечка инфекција со *E. canis*. Истовремено, *E. canis* предизвикува намалување на рецепторите на главниот комплекс за хистокомпатибилност од класа II, со што ја предизвикува клиничката прогресија на лајшманијата (155).

Во нашето истражување кај вкупно 28,57 % од болните кучиња беше присутна и коинфекција со лишманија (IFAT титар  $\geq 1:160$ ), од кои 13 кучиња беа контролирани по завршување на терапијата за моноцитна ерлихиоза и беше забележано минимално подобрување на лабораториските резултати кај 6 (46,15 %) (прилог 1, 2). Клиничката манифестација и лабораториските промени кај двете болести се многу слични (156).

Резултатите од нашето истражување ги потврдуваат резултатите од истражувањето на Cortese и сор. (157), констатирајќи дека ефикасноста на терапијата и корекцијата на хематолошките и биохемиските параметри е намалена во случаи на коинфекција. Истражувањето спроведено на природно инфицирани кучиња од страна на Mekuzas и сор. (154), дури 35 (од вкупно 43) имале коинфекција на ерлихија со лајшманија, при што клиничките знаци биле поизразени кај кучињата со двојна инфекција заради синергиски патолошки ефект меѓу патогените.

## 7. ЗАКЛУЧОЦИ

Од спроведените истражувања во оваа студија на опфатената хетерогена популација на кучиња, врз база на клиничката слика, лабораториската анализа, серолошката и молекуларната дијагностика, како и мониторингот на спроведениот терапевтски протокол за *E. canis*, произлегоа следниве заклучоци:

1. Најзастапени хематолошки промени кај МЕК се тешка тромбоцитопенија и слаба до умерена анемија, додека промените на белите крвни клетки се непостојани и леукопенијата не секогаш е застапена, зависно од фазата на болеста, како и вирулентноста на причинителот. Најчесто застапени промени при биохемиската анализа на серумот се концентрацијата на албумините и вкупните протеини, како и алкалната фосфатаза, како последица од оштетувањето на моноцитно-макрофагниот систем на внатрешните органи што го предизвикува оваа бактерија.
2. Следењето на концентрацијата на Ц-реактивниот протеин помеѓу групите здрави и болни животни, не може да се користи како индикатор во следењето на болеста, текот на терапијата и дијагностичкиот пристап на МЕК.
3. Серолошкиот тест ELISA има поголема усогласеност на позитивните резултати со позитивните qPCR-резултати.
4. Молекуларната дијагностика е најпрецизен метод за детекција на *E. canis*, но неговата интерпретација треба да се изврши во спрега со останатите наоди, бидејќи кај кучиња во супклиничка или хронична фаза од болеста може да се добијат негативни резултати.
5. Резултатите од серолошките тестирања не се во согласност со qPCR-резултатите, поради можноста дека станува збор за супклиничка или хронична фаза на болеста.
6. Клинички болните кучиња со лабораториски наод на тромбоцитопенија, анемија, хипоалбуминемија и зголемена алкална фосфатаза, се тестираат серолошки за постоење антитела против *E. canis*. Доколку постои сомневање во точноста на резултатите, препорачано е да се направи дополнителна потврдна дијагноза со помош на методот PCR.
7. Најдобар начин на следење на успешноста на терапијата се крвната слика, биохемиската анализа на серумот и негативен PCR за докажување на

елиминацијата на причинителот. Клиничко подобрување, како и постоењето на значителна разлика помеѓу болните кучиња и кучињата по терапија во однос на лабораториските параметри и негативен резултат на PCR се доволни параметри за да се потврди успешноста на терапевтскиот протокол.

8. Кучиња на возраст од 1 до 8 години без редовна превентива се најпредиспонирана категорија, без разлика на полот. Оваа група може да се смета како резервоар на болеста и ја зголемуваат можноста за распрстранување на болеста.
9. Неопходно е да се испита присуството на *L. infantum* кај болните кучиња поради можноста за коинфекција и приспособување на терапевтскиот протокол.

## 8. ПРИЛОГ

Прилог 1. Хематолошки резултати кај кучиња со коинфекција

Пациент	Параметар																	
	Црвени крвни клетки (RBC) x 10 <sup>12</sup> /L		Хематокрит (HCT) %		Хемоглобин (Hgb), g/dL		Тромбоцити (PLT) *10 <sup>9</sup> /L		Бели крвни клетки (WBC) *10 <sup>9</sup> /L		Лимфоцити *10 <sup>9</sup> /L		Моноцити *10 <sup>9</sup> /L		Неутрофили *10 <sup>9</sup> /L		Еозинофили *10 <sup>9</sup> /L	
	пред терапија	после терапија	пред терапија	по терапија	пред терапија	по терапија	пред терапија	по терапија	пред терапија	по терапија	пред терапија	по терапија	пред терапија	по терапија	пред терапија	по терапија	пред терапија	по терапија
Ajaks 27	4,01	4,84	21,6	26,54	9,8	12,1	200	298	10,2	7,3	3,7	2,7	1	0,9	5,4	3,4	0,1	0,3
Arap 26	5,68		28,60		12,80		66,00		12,10		2,20		1,30		7,90		0,70	
Askel 52	4,66	7,44	30,43	48,31	9,2	15,2	102	200	7,14	13,09	3,13	4,97	0,22	1,83	3,69	6,19	0,1	0,1
Astor 129	3,9		19,2		8,8		178		4,7		0,3		0,4		3,6		0,4	
Bak 159	5,42	5,45	29,3	28,7	12,9	12,6	113	105	4,4	5	0,2	0,3	0,3	0,3	3,7	3,9	0,2	0,5

Baron-61	7,41		45,03		14,4		204		13,74		4,66		1,29		7,68		0,1	
Bela 51	4,97	7,45	28,7	47,42	11,9	14,6	28	521	9,5	26,19	2,1	3,09	0,7	1,69	3,9	21,21	2,8	0,2
Belka 1	4,37	2,74	23,6	15,5	10,7	7,1	46	104	6,7	5,7	1,3	1	0,4	0,4	4,7	4,1	0,3	0,2
Bonbonita 105	2,58	4,66	13,8	26,1	5,9	10,7	66	340	25,5	10,9	2,6	1,4	2,4	1	20,4	8,4	0,1	0,1
Bono 163	3,98	5,43	26,6	32,9	9,3	10,6	10	200	18,6	14,8	8,3	7,7	6,7	5,1	3,5	1,9	0,1	0,1
Bruno 83	1,76	3,75	9,6	19,2	5	8,9	177	227	10,8	8,2	2,6	1,6	1,3	0,7	6,9	5,6	0	0,3
Doli 56	5,36	7,11	28,4	40,2	12,6	18,1	19	316	10	17,5	2,6	3,5	1	0,9	5,8	12,3	0,6	0,8
Dzoni 45	4,25		24		10,1		50		10,4		3,6		1,2		4,7		0,9	
Kaljush 12	2,68		15,8		6,8		41		3,4		0,9		0,3		2,2		0	
Kan 25	3,64	2,95	23,3	19,5	7,8	6,4	79	173	6,3	6,5	2,7	1,8	1,7	1,7	1,9	3	0,1	0
Kavadar 169	3,09		14,5		6,5		57		20,8		1,2		1		18,5		0,1	
Lea 157	5,4	4,72	30,8	27,5	13,8	11,9	58	95	7,2	3,7	0,6	0,2	0,4	0,3	6	3	0,2	0,2

Maks 55	4,4	6,44	28,9	44,81	13,8	13,2	176	194	5,8	7,03	3,8	3,01	0,5	0,41	1	3,6	0,5	0
Mona 79	2,31	7,08	10,6	41,5	4,6	12,7	49	223	14,9	7,2	3,1	4,6	1	1	10,5	1,5	0,3	0,1
Oskar 142	3,28		18,4		7,9		22		11,8		0,8		0,9		10,1		0	
Reni 117	5,35	5,56	26,8	28,3	12,2	12,8	46	185	3,8	7,3	1	1,6	0,4	0,7	2,3	4,6	0,1	0,4
Stela 46	2,3		15,2		6,1		39		3,1		0,6		0,3		2,1		0,1	
Uljki 39	3,68		18,9		8,4		191		7,2		0,8		0,5		5,6		0,3	
Yia 155	1,97		11		4,7		92		27,8		3,5		3,2		21		0,1	

Прилог 2. Биохемиски резултати кај кучиња со коинфекција

Пациент	Параметар/референтна вредност							
	Аспартат аминотрансфера за (AST) 8,9 - 48,5 U/L	Аланин аминотрансфе раза (ALT) 8,2 - 57,3 U/L	Алкална фосфатаза (ALKP) 10,6 - 100,7 U/L	Албумини (ALB) 25,8 - 39,7 g/L	Глобулини (GLOB) 20,6 - 37,0 g/L	Вкупни протеини (TP) 55,1 - 75,2 g/L	Уреа 3,1 - 9,2 mmol/L	Креатинин 44,3 - 138,4 μmol/L

	Пред терапи ја	По терапиј а	Пред терап ија	По терап ија	Пред терап ија	По терап ија	Пред терап ија	По терап ија	Пред терап ија	По терап ија	Пред терап ија	По терап ија	Пред терап ија	По терап ија	Пред терап ија	По терап ија
Ajaks 27	24,44	24,7	24,07	18,81	103,8	262,3	13,14	14,41	71,18	40,26	84,32	54,67	19,7	8	180,3	113
Arap 26	24,18		42		73,6		18,18		27,9		46,08		2,06		134,7 9	
Askel 52	40,3	63,18	75,26	62,57	93,7	88,7	18,89	26,44	42,17	28,03	61,06	54,47	3,72	5,9	97,5	86,24
Astor 129	7,28		49,88		114,5		26,09		26,84		52,93		4,19		117,7 8	
Bak 159	30,94	91,77	208,7 1	164,9 6	173,6	103,2	17,03	17,03	57,02	40,88	74,05	57,91	4,98	4,68	119,2 5	147,7 5
Baron- 61	31,72		34,57		106,9		21,21		34,06		55,27		1,83		55,8	
Bela 51	55,64	44,2	70,45	15,31	473,1	174,9	20,92	24,56	15,25	19,86	36,17	44,42	7,2	4,02	100,3	57,86
Belka 1	28,86	61,36	374,9 8	41,57	56,6	197,5	22,16	17,66	47,63	46,28	69,79	63,94	4,4	2,49	60	70,24

Bonboni ta 105	29,38	40,82	90,57	72,63	307,6	134	5,97	11,86	34,4	50,34	40,37	62,2	16,58	6,7	123,5	90,1
Bono 163	24,7	37,7	60,38	73,51	84,3	84,3	22,97	22,21	41,31	44,34	64,28	66,55	8,68	4,09	152,0 3	207,7
Bruno 83	34,32	28,08	20,56	20,13	42,1	73	21,5	17,09	33,56	38,63	55,16	55,72	12,58	27,81	135,5 8	182,6 5
Doli 56	125,83	18,46	262,5 3	63,13	1382, 8	1382, 8	16,76	29,07	36	27,83	52,76	56,9	19,94	5,49	198,8	99,3
Dzoni 45	108,93		283,5 3		1376, 5		13,72		23,12		36,84		3,34		98,6	
Kaljush 12	33,8		82,2		281,8		19,51		50,83		70,34		3,6		78,6	
Kan 25	90,47	64,22	59,07	85,76	79,9	85,6	16,25	16,58	54,53	33,29	70,78	49,87	7,6	17,9	119	107
Kavadar 169	38,48		38,5		514		9,13		55,11		64,24		8,28		118,8 9	

Lea 157	13	13,78	38,07	51,63	97,5	86,8	26,31	26,01	30,18	20,29	56,49	46,3	30,78	19,39	307,5 6	277,6 3
Maks 55	35,1	54,34	63,44	131,2 6	161	154,1	18,5	23,78	24,49	43,02	43,99	66,8	3,84	3,45	107,3 8	105,2 9
Mona 79	49,14	41,34	55,57	81,38	105,7	144,1	17,56	21,94	53,25	39	70,81	60,94	4,34	3,19	79,78	42,74
Oskar 142	35,88		70,01		352,3		10,91		58,47		69,38		5,09		87,7	
Reni 117	24,44	33,54	31,5	43,75	51,6	38,4	25,44	31,18	37,67	30,27	63,12	61,45	3,71	8,47	72,08	159,2 2
Stela 46	46,8		24,5		61,7		18,18		55,34		37,16		4,76		119	
Uljki 39	17,68		130,3 9		82		14,1		74,02		59,92		40		343,6 1	
Yia 155	22,88		145,7		387,1		18,4		54,24		72,64		41,42		224,2 2	

Прилог 3. Позитивни qPCR-примероци и резултатот по терапија

Број на куче	Ct вредност	Резултат по терапија
25	32,955	No Ct
27	19,391	No Ct
33	36,919	No Ct
34	35,621	No Ct
38	37,889	No Ct
42	31,411	No Ct
45	28,658	/
47	34,617	No Ct
51	24,817	No Ct
53	33,318	/
54	25,411	/
56	27,420	No Ct
67	28,586	No Ct
70	33,922	No Ct
72	27,840	No Ct
74	27,190	No Ct
78	34,217	No Ct
83	33,650	No Ct

86	24,418	/
88	29,904	/
101	30,470	No Ct
105	39,261	No Ct
106	37,040	No Ct
107	31,223	/
108	25,440	/
110	29,707	No Ct
113	31,641	/
114	35,821	No Ct
117	32,952	No Ct
120	30,452	/
125	38,213	No Ct
126	31,760	/
127	32,550	No Ct
146	33,624	/
150	35,814	/
155	28,459	/

Прилог 4. Резултати од серолошките тестови и qPCR за сите клинички болни кучиња

Пациент	Подгрупа	BioNote	IDEXX 4dx	IFAT Leishmania	ELISA	PCR пред терапија	PCR по терапија
Aba 122	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	neg	
Ada 144	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	neg	
Ajaks 27	<b>PCR+</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	poz	neg
Albert 78	<b>PCR+</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg
Aleks 70	<b>PCR+</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg
Anja 86	<b>PCR+</b>		neg	neg	<b>poz</b>	<b>poz</b>	
Arap 26	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	
Aron 14	PCR-	<b>poz</b>	neg	neg	<b>poz</b>	neg	
Aron 150	<b>PCR+</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	<b>poz</b>	
Aron 32	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	neg	neg
Arta 60	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	neg	neg
Askel 52	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	neg
Astor 129	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	
Atos 59	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	neg	neg
Bak 159	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	neg
Bak 30	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	neg	
Bak 4	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	neg	
Baron- 61	PCR-	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	
bejbi 34	<b>PCR+</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg
Bela 51	<b>PCR+</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg
Belka 1	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	neg
Bendzi 126	<b>PCR+</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	<b>poz</b>	
Berta Kicevo 3	PCR-	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	neg	neg
Bob 106	<b>PCR+</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg
Bonbonita 105	<b>PCR+</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	<b>poz</b>	neg

Bono 163	PCR-	poz	poz	poz	poz		
Bruno 13	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	
Bruno 83	PCR+	poz	poz	poz	poz	poz	neg
Demon 72	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
Doli 56	PCR+	poz	poz	poz	poz	poz	neg
Dona 54	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	
Dora 5	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	
Dora 9	PCR-	poz	neg	neg	poz	neg	
Dzina 107	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	
Dzoni 45	PCR+	poz	poz	poz	poz	poz	
Elija47	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
Ema 15	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	
Garo 145	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	
Hektor 10	PCR-	poz	neg	neg	poz	neg	neg
Kajla 162	PCR-	poz	poz	neg	poz		
Kaljush 12	PCR-	poz	neg	poz	poz	neg	
Kan 25	PCR+	poz	poz	poz	poz	poz	neg
Kara 110	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
Karo 53	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	
Kavadar 169	PCR-	poz	poz	poz	poz		
Kiki 109	PCR-		neg	neg	poz	neg	
Koki 114	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
koki 134	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	neg
Kuc 44	PCR-	neg	poz	neg	neg	neg	
Kumanovo 92	PCR-	poz	poz	neg	poz		
Lara 146	PCR+	neg	poz	neg	poz	poz	
Lara 33	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
Lea 157	PCR-	neg	neg	poz	poz	neg	neg
Lea 98	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	
Lejdi 88	PCR+	poz	neg	neg	poz	poz	

Lejla 138	PCR-	poz		neg	poz	neg	neg
Leo 102	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	
Leo 104	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	neg
Leo 152	PCR-	neg	neg	neg	poz	neg	
Leo 22	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	neg
Leo 66	PCR-	poz	neg	neg	neg	neg	neg
Lide 108	PCR+	neg	poz	neg	poz	poz	
Maks 55	PCR-	poz	poz	poz	neg	neg	neg
Malisha 23	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	neg
Masha 49	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	
Maza 2	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	neg
Medo 21	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	
Mice 113	PCR+	neg	neg	neg	poz	poz	
Mici 127	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
Milco 20	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	neg
Mona 79	PCR-	poz	poz	poz	poz	neg	neg
Mona 90	PCR-	neg	neg	neg	poz	neg	
Nero 125	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
Oskar 142	PCR-	poz	poz	poz	poz	neg	
Princ 75	PCR-	poz	poz	neg	poz	neg	neg
Puki 67	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
Reni 117	PCR+	poz	poz	poz	poz	poz	neg
Shila 120	PCR+	neg	neg	neg	poz	poz	
Simon 36	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
Stela 46	PCR-	poz	poz	poz	poz	neg	
Timi Daniela 42	PCR+	poz	poz	neg	poz	poz	neg
Tobi 74	PCR+	poz	neg	neg	neg	poz	neg
Uljki 39	PCR-	poz		poz	poz	neg	
Yia 155	PCR+	poz	poz	poz	poz	poz	

\*poz= позитивно, neg=негативно

## 9. БЛАГОДАРНОСТ

За големата поддршка и помош во текот на сите фази на изработката и реализацијата на докторската дисертација изразувам огромна благодарност на мојот ментор, проф. д-р Тони Довенски.

Голема благодарност до колегите од ветеринарната амбуланта „д-р Налетоски“ кои учествуваа во истражувањето.

Благодарност до колегите од Универзитетската ветеринарна болница при факултетот (Ксенија Илиевска, Ирена Целевска, Тодор Новаков и Филип Тројачанец), кои помогнаа во собирањето и извршувањето на потребните клинички испитувања.

Голема благодарност до д-р Erich Zwegarth од Institute of Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Германија, за добиените контролни соеви на *Ehrlichia canis* потребни за изведување на молекуларните испитувања.

Му се заблагодарувам на доц. д-р Кирил Крстевски за одвоеното време при имплементација и интерпретацијата на молекуларните и серолошките методи, како и на колешките од Лабораторија за серологија и молекуларна дијагностика (Зага Попова, Гордана Тулова) за техничката поддршка во изведувањето на анализите.

На колегата Мирослав Радески, ДВМ, му изразувам голема благодарност за вложениот труд и одвоеното време за статистичката обработка на добиените резултати.

Во целост му благодарам на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје што ми овозможи да го реализирам ова истражување.

Му благодарам на моето семејство за трпеливоста и безусловната поддршка при изработката на докторската дисертација. Нивната љубов и верба во мене беа пресудни за успешно завршување на дисертацијата.

## 10. ЛИТЕРАТУРА

1. Donatien, A., Lestoquard, F., 1935. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. Bull Soc Pathol Exot. 28, 418–9.
2. Skotarczak, Bogumila. "Canine ehrlichiosis." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10.2 (2003): 137-142.
3. Mavromatis, K., Doyle, C. K., Lykidis, A., Ivanova, N., Francino, M. P., Chain, P., Shin, M., Malfatti, S., Larimer, F., Copeland, A., Detter, J. C., Land, M., Richardson, P. M., Yu, X. J., Walker, D. H., McBride, J. W., Kyrpides, N. C. , 2006. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium Ehrlichia canis Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. *Journal of Bacteriology* 188 (11): 4015–23.
4. Harrus S., Waner T., 2005. Ehrlichiosis and anaplasmosis. Part 1: Ehrlichia canis genogroup. In: Shaw SE, Day MJ, eds. *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. London: Manson Publishing, 1, 20–6.
5. Greig B., Armstrong J.P., 2006. Canine granulocytotropic anaplasmosis (A. phagocytophilum infection). In: Greene CE, ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders company, 219-24.
6. Dumler, J.S., Asanovich, K.M., Bakken, J.S., Richter, P., Kimsey, R., Madigan, J.E., 1995. Serologic cross-reactions among Ehrlichiaequi, Ehrlichia phagocytophila, and human granulocytic ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1098–1103.
7. Dumler, J. Stephen, Anthony F. Barbet, C. P. Bekker, Gregory A. Dasch, Guy H. Palmer, Stuart C. Ray, Yasuko Rikihisa, Fred R. Rurangirwa, 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51, no. 6: 2145-2165.
8. Dumler, J. S., Walker, D. H., 2001. Tick-borne ehrlichioses. *The Lancet infectious diseases*, 1, 21-28.
9. Perez, M., Y. Rikihisa, B., Wen., 1996. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2133–2139

10. Greig, B., Asanovich, K.M., Armstrong, P.J., Dumler, J.S., 1996. Geographic, clinical, serologic and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J. Clin. Microbiol.* 34, 44–48.
11. Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Hancock, S.I., 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2645–2651.
12. Hamel, D., Silaghi, C., Pfister, K., 2013. Arthropod-borne infections in travelled dogs in Europe. *Parasite*, 20.
13. Carlos, R. S. A., Carvalho, F. S., Wenceslau, A. A., Almosny, N. R. P., Albuquerque, G. R., 2011. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20 (3), 210-214.
14. Maazi, N., Malmasi, A., Shayan, P., Nassiri, S. M., Salehi, T. Z., Fard, M. S., 2014. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* in naturally exposed dogs in Iran: an analysis on associated risk factors. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(1), 16-22.
15. Rikihisa, Yasuko, 1991. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical microbiology reviews* 4.3: 286-308.
16. Beugnet F, Marié J-L., 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol*, 163:298–305.
17. Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F. S., & Schlesinger, Y., 2009. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary microbiology*, 136(3), 321-325.
18. Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S. Solano-Gallego, L., 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & vectors*, 8(1), 75.
19. Groves, M. G., Dennis, G. L., Amyx, H. L., Huxsoll, D. L., 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American journal of veterinary research*, 36(7), 937-940.
20. Huxsoll, D. L., 1976. Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): a review. *Veterinary parasitology*, 2(1), 49-60.
21. Hamel, D., Silaghi, C., Knaus, M., Visser, M., Kusi, I., Rapti, D., Pfister, K., 2009. Detection of *Babesia canis* subspecies and other arthropod-borne diseases in dogs from Tirana, Albania. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(3), 42-45.

22. Potkonjak, A., Savic, S., Jurisic, A., Petrovic, A., Suvajdzic, L., Lako, B., Novakovic, Z., 2013. Seroepidemiological research of canine monocytic ehrlichiosis in the autonomous province of Vojvodina, Serbia. *Acta Scientiae Veterinariae*, 41(1106), 1-8.
23. Kontos, V.I., Athanasiou, L.V., Bitschava D., 1998. Serological study of ehrlichiosis in dogs with clinical leishmaniasis. *J Hellenic Vet Med Soc*, 171-174
24. Tsachev, I., Papadogiannakis, E. I., Kontos, V., Zarkov, I., Petrov, V., Pelagic, V., 2006. Seroprevalence of Ehrlichia canis infection among privately-owned dogs in northern Bulgaria (In Greek and English). *J Hellenic Vet Med Soc*, 57(3): 212-216
25. Stefanovska, J., Z. Kochevski, C. Iskra, R. Farkas, N. Ivancho, S. Mrenoshki, D. Mitrov, Pendovski L., 2012. Serological evidence of Ehrlichia canis and Leishmania infantum co-infection in naturally exposed dogs on the territory of Republic of Macedonia. In *Book of Proceedings, Days of Veterinary Medicine 2012, 3rd International Scientific Meeting, Macedonia, 2-4 September 2012.*, pp. 38-39. University " Ss Cyril and Methodius" in Skopje, Faculty of Veterinary Medicine in Skopje.
26. Siarkou, V.I., Mylonakis, M.E., Bourtzi-Hatzopoulou, E. and Koutinas, A.F., 2007. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of Ehrlichia canis strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. *Veterinary microbiology*, 125(3), 304-312.
27. Lewis GE, Ristic M, Smith RD, 1977. The brown dog tick Rhipicephalus sanguineus and the dog as experimental hosts of Ehrlichia canis. *Am J Vet Res* 38:1953-1955.
28. Gaunt, S.D., Corstvet, R.E., Berry, C.M., Brennan, B., 1996. Isolation of Ehrlichia canis from dogs following subcutaneous inoculation. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1429–1432.
29. McBride, J.W., Walker, D.H., 2011. Molecular and cellular pathobiology of Ehrlichia infection: Targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. *ExpertReviews in Molecular Medicine* 13, E3.
30. Harrus, S., 2015. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 204(3), 239-240.
31. Mylonakis, M. E., Siarkou, V. I., Koutinas, A. F., 2010. Myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): an update on the pathogenesis, diagnosis and management. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 65(4), 129-135.
32. Harrus, S., Waner, T., Strauss-Ayali, D., Bark, H., Jongejan, F., Hecht, G., Baneth, G., 2001. Dynamics of IgG1 and IgG2 subclasses response in dogs naturally and experimentally infected with Ehrlichia canis. *Vet. Parasitol.* 99:63-71.

33. Tajima, T. and Rikihisa, Y.: Cytokine responses in dogs infected with Ehrlichia canis Oklahoma strain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1063:429-432, 2005
34. Woody, B. J., and J. D. Hoskins. 1991. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* 21:75-98
35. Harrus, S., P. H. Kass, E. Klement, and T. Waner. 1997. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet. Rec.* 141:360-363.
36. Nyindo, M., D. L. Huxsoll, M. Ristic, I. Kakoma, J. L. Brown, C. A. Carson, E. H. Stephenson, 1980. Cell-mediated and humoral immune responses of German shepherd dogs and beagles to experimental infection with Ehrlichia canis. *Am. J. Vet. Res.* 41: 250-254.
37. Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F., & Cornelissen, A. W., 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of clinical microbiology*, 37(9), 2745-2749.
38. Harrus, S., Day, M.J., Waner, T., Bark, H., 2001. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with Ehrlichia canis. *Vet Microbiol.* 83:343-349.
39. Harrus, S., T. Waner, A. Keysary, I. Aroch, H. Voet, H. Bark., 1998. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62:15-27
40. Harrus, S., Waner, T., 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): an overview. *The Veterinary Journal*, 187(3), 292-296.
41. de Castro, M.B., Machado, R.Z., de Aquino, L.P., Alessi, A.C. and Costa, M.T., 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.* 119: 73-86.
42. Waner, T., Harrus, S., 2013. Canine monocytic ehrlichiosis-from pathology to clinical manifestations. *Isr J Vet Med*, 68(1), 12-18.
43. Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T., Shaw, S., 2004. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental Ehrlichia canis infection. *Antimicrob. Chemoth.* 48: 4488-4490.
44. Reardon, M.J., Pierce, K.R., 1981. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Vet. Pathol.* 18: 48-61.

45. Mylonakis, M.E., Borjesson, D.L., Leontides, L., Siarkou, V.I., Theodorou, K., Koutinas, A.F., 2011. Cytologic patterns of lymphadenopathy in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Clin. Pathol.*40: 78-83.
46. Komnenou, A.A., Mylonakis, M.E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, E., Dessiris, A., Koutinas, A.F., Ofri, R., 2007. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Veterinary Ophthalmology* 10, 137–142.
47. Panciera, R.J., Ewing, S.A., Confer, A.W., 2001. Ocular histopathology of Ehrlichial infections in the dog. *Vet. Pathol.* 38: 43-6.
48. Massa, K.L., Gilger, B.C., Miller, T.L., Davidson, M.G., 2002. Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). *Vet. Ophthalmol.*5: 93-98.
49. Harrus, S., Ofri, R., Aizenberg, I., Waner, T., 1998. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. *Vet. Parasitol.* 78: 155-160.
50. Diniz, P.P., de Moraes, H.S., Breitschwerdt, E.B., Schwartz, D.S., 2008. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *J. Vet. Int. Med.* 22: 1136-1143.
51. Gal, A., Harrus, S., Arcoh, I., Lavy, E., Aizenberg, I., Mekuzas-Yisaschar, Y., Baneth, G., 2007. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. *Canadian Veterinary Journal* 48, 619–622.
52. Waner, T., Harrus, S., Bark, H., Bogin, E., Avidar, Y., Keysary, A., 1997. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology* 69, 307–317.
53. Harrus, S., Waner, T., Bark, H., 1997. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. *Compend. Contin. Educ. Prac. Vet.* 19: 431-444.
54. Harrus, Shimon, Trevor Waner, Itzhak Aizenberg, Janet E. Foley, Amy M. Poland, Hylton Bark., 1998. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology* 36, no. 1: 73-76.
55. Ristic M, Holland CJ., 1993. Canine ehrlichiosis. In: Woldehiwet Z, Ristic M (Eds): *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*, 169-186. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
56. Waner, T., 2008. Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Medicine*, 63(1).

57. Abeygunavardena, I., I. Kakoma, R. D. Smith., 1990. Pathophysiology of canine ehrlichiosis, p. 78-92, In J. C. Williams and I. Kakoma (ed.), Ehrlichiosis, a vector-borne disease of animals and humans. Kluwer Academic Publishers, Boston.
58. Codner, E. C., T. Caceci, G. K. Saunders, C. A. Smith, J. L. Robertson, R. A. Martin, and G. C. Troy. 1992. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection. *Am. J. Vet. Res.* 53:2286–2291
59. Harrus, S., T. Waner, Y. Avidar, E. Bogin, P. Huo-Cheng, and H. Bark. 1996. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.* 66:241–249.
60. Shimada, T., Ishida, Y., Shimizu, M., Nomura, M., Kawato, K., Iguchi, K., Jinbo, T., 2002. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with Ehrlichia canis. *Veterinary Research Communication* 26, 171–177.
61. Rikihisa, Y., Yamamoto, S., Kwak, I., Iqbal, Z., Kociba, G., Mott, J., Chichanasiriwithaya, W., 1994. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with Ehrlichia canis. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 912–917.
62. Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168(1), 28-40.
63. Pepys MB, Hirschfield GM., 2003. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.*, 111:1805–1812.
64. Du Clos, T.W., Mold, C., 2001. The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. *Current Opinion in Infectious Diseases* 14, 289–293.
65. Eckersall, P.D., 2000. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire* 151, 577–584.
66. Yamamoto, S., Shida, T., Honda, M., Ashida, Y., Rikihisa, Y., Odakura, M., Hayashi, S., Nomura, M., Isayama, Y., 1994. Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with Bordetella bronchiseptica (phase I cells). *Veterinary Research Communications* 18, 347–357.
67. Otabe, K., Ito, T., Sugimoto, T., Yamamoto, S., 2000. C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury. *Laboratory Animals* 34, 434–438.
68. Kjelgaard-Hansen, M., Jensen, A.L. and Kristensen, A.T., 2003. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(2), 81-87.

69. Koivunen, M.E. and Krogsrud, R.L., 2015. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Laboratory Medicine*, 37(8), 490-497.
70. Mylonakis, M. E., Ceron, J. J., Leontides, L., Siarkou, V. I., Martinez, S., Tvarijonaviciute, A., Harrus, S., 2011. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 811-817.
71. Doumatey, A.P., Zhou, J., Adeyemo, A., Rotimi, C., 2014. High sensitivity Creactive protein (Hs-CRP) remains highly stable in long-term archived human serum. *Clin Biochem*, 47(4-5), 315-8.
72. Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Billinis, C., Leontides, L.S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T., Fytianou, A., 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology* 91, 197–204.
73. Kakoma, I., Hansen, R.D., Anderson, B.E., Hanley, T.A., Sims, K.G., Liu, L., Bellamy, C., Long, M.T., Baek, B.K., 1994. Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 170–175.
74. Bartsch, R.C., Greene, R.T., 1996. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10, 271–274.
75. Krawczak, F. D. S., Reis, I. A., Silveira, J. A. D., Avelar, D. M., Marcelino, A. P., Werneck, G. L., Paz, G. F., 2015. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods?. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(1), 64-68.
76. Suksawat, J., Hegarty, B. C., Breitschwerdt, E. B., 2000. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(1), 50-55.
77. Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R., Sainz, A., 2013. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasit Vectors*, 6, 117.
78. Harrus, S., Alleman, A.R., Bark, H., Mahan, S.M., Waner, T., 2002. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology* 86, 361–368

79. Stillman, B.A., Monn, M., Liu, J., Thatcher, B., Foster, P., Andrews, B., Little, S., Eberts, M., Breitschwerdt, E.B., Beall, M.J. Chandrashekar, R., 2014. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245(1), 80-86.
80. Chandrashekar, R., Mainville, C.A., Beall, M.J., O'Connor, T., Eberts, M.D., Alleman, A.R., Gaunt, S.D., Breitschwerdt, E.B., 2010. 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.
81. Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, A.W., 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with specialempphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology* 95, 1–15.
82. Cardenas, A.M., Doyle, C.K., Zhang, X., Nethery, K., Corstvet, R.E., Walker, D.H., McBride, J.W., 2007. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 123–128.
83. Waner, T., Strenger, C., Keysary, A., Harrus, S., 1998. Kinetics of serologic crossreactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66, 237–243.
84. Yisaschar-Mekuzas Y, Jaffe CL, Pastor J, Cardoso L, Baneth G., 2013. Identification of *Babesia* species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, and evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. *Vet Parasitol.* 191:367-373.
85. Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB., 2009. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends Parasitol.* 25:228-235.
86. de Castro Ferreira, E., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., da Silva, E.S., Schallig, H., Gontijo, C.M.F., 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary parasitology*, 146(3-4), 235-241.

87. Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of clinical microbiology*. 43(11), 5515-5519.
88. Hegarty, B.C., Levy, M.G., Gager, R.F., Breitschwerdt, E.B., 1997. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9, 32–38.
89. Lakshmanan, B., John, L., Gomathinayagam, S., Dhinakarraj, G., 2007. Molecular detection of *Ehrlichia canis* from blood of naturally infected dogs in India. *Veterinarski arhiv*, 77(4), 307.
90. Lasta, C. S., Santos, A. P. D., Messick, J. B., Oliveira, S. T., Biondo, A. W., Vieira, R. F. D. C., Gonzalez, F. H. D., 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(3), 360-366.
91. Parmar, C., Pednekar, R., Jayraw, A., Gatne, M., 2013. Comparative diagnostic methods for canine ehrlichiosis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(3), 282-290.
92. McBride, J. W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Chinsangaram, J., Akita, G. Y., Osburn, B.I., 1996. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J. Vet. Diagn. Investigat.* 8: 441–447.
93. Joshi, M., Deshpande, J. D., 2011. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.
94. Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W., Rikihisa, Y., 1994. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1658–1662.
95. Mylonakis, Mathios E., Alex F. Koutinas, Edward B. Breitschwerdt, Barbara C. Hegarty, Charalambos D. Billinis, Leonidas S. Leontides, Vassilios S. Kontos., 2004. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 40, no. 3, 174-184.
96. Stich, R.W., Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Needham, G.R., Grover, D.L., Jittapalapong, S., 2002. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 540–546.

97. Sirigireddy, K.R., Ganta, R.R., 2005. Multiplex detection of Ehrlichia and Anaplasma species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Diagnostics* 7, 308–316.
98. McClure, J. C., Crothers, M. L., Schaefer, J. J., Stanley, P. D., Needham, G. R., Ewing, S. A., Stich, R. W., 2010. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), 5012-5020.
99. Fourie JJ, Horak I, Crafford D, Erasmus HL, Botha OJ., 2015. The efficacy of a generic doxycycline tablet in the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. *J S Afr Vet Assoc*, 86:1193.
100. Harrus, S., T. Waner, I. Aizenberg, H. Bark., 1998. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2140–2142.
101. Iqbal, Z., and Y. Rikihisa., 1994. Reisolation of Ehrlichia canis from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *J. Clin. Microbiol.* 32:1644–1649.
102. Wen, B., Y. Rikihisa, J. M. Mott, R. Greene, H.-Y. Kim, N. Zhi, G. C. Couto, A. Unver, R. Bartsch., 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of Ehrlichia canis infection in dogs treated with doxycycline. *J. Clin. Microbiol.* 35:1852–1855.
103. Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty, S. I. Hancock., 1998. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two Ehrlichia canis strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:362–368.
104. Schaefer, J. J., J. Kahn, G. R. Needham, Y. Rikihisa, S. A. Ewing, R. W. Stich., 2008. Antibiotic clearance of Ehrlichia canis from dogs infected by intravenous inoculation of carrier blood. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149: 263–269.
105. Schaefer, J. J., G. R. Needham, W. G. Bremer, Y. Rikihisa, S. A. Ewing, R. W. Stich. 2007. Tick acquisition of Ehrlichia canis from dogs treated with doxycycline hyclate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3394–3396.
106. Kelly. P.J., Matthewman, L.A., Brouqui, P. and Raoult, D., 1999. Lack of susceptibility of Ehrlichia canis to imidocarb dipropionate in vitro. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 69: 55-56, 1998.
107. Waner, T., Keysary, A., Bark, H., Sharabani, E., Harrus, S., 1999. Canine monocytic ehrlichiosis-an overview. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 54(4), 103-107.

108. Ismail N, Bloch KC, McBride JW., 2010. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med.* 30: 261–92.
109. Theodorou, K., Mylonakis, M.E., Siarkou, V.I., Leontides, L., Koutinas, A.F., Koutinas, C.K., Kritsepi-Konstantinou, M., Batzias, G., Flouraki, E., Eyal, O., Kontos, V., 2013. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1619-1626..
110. Ogunkoya AB, Adeyanju JB, Aliu YO., 1981. Experiences with use of Imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. *J Small AnimPract.* 22:775–777.
111. Matthewman, D., 1994. Further evidence for the efficacy of imidocarb dipropionate in the treatment of Ehrlichia canis infections. *Journal of the South African Veterinary Association*, 65(3), 104-107.
112. Van Heerden J, Van Heerden A., 1981. Attempted treatment of canine ehrlichiosis with imidocarb dipropionate. *J S Afr Vet Assoc.* 52: 173–175.
113. Sainz, A., Tesouro, M. A., Amusatogui, I., Rodriguez, F., Mazzucchelli, F., Rodriguez, M., 2000. Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(2), 134-139.
114. Neer, T. M., E. B. Breitschwerdt, R. T. Greene, and M. R. Lappin., 2002. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *American College of Veterinary Internal Medicine. J. Vet. Intern. Med.* 16:309–315.
115. Shipov, A., Klement, E., Reuveni-Tager, L., Waner, T., & Harrus, S., 2008. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary parasitology*, 153(1), 131-138.
116. Otranto, D., Paradies, P., Testini, G., Latrofa, M.S., Weigl, S., Cantacessi, C., Mencke, N., de Caprariis, D., Parisi, A., Capelli, G., Stanneck, D., 2008. Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent Ehrlichia canis exposure in dogs under natural conditions. *Veterinary parasitology*, 153 (3-4), 320-328.
117. Davoust, B., Marie, J.L., Mercier, S., Boni, M., Vandeweghe, A., Parzy, D. Beugnet, F., 2003. Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. *Veterinary parasitology*, 112(1-2), 91-100.
118. Fourie J, Ollagnier C, Beugnet F, Luus G, Jongejan F., 2013. Prevention of transmission of Ehrlichia canis by Rhipicephalus sanguineus ticks to dogs treated with a combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene (CERTIFECT®). *Vet Parasitol.* 193:223–8.

119. Jongejan, F., De Vos, C., Fourie, J. J., & Beugnet, F., 2015. A novel combination of fipronil and permethrin (Frontline Tri-Act®/Frontect®) reduces risk of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* and of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-10.
120. Rudoler, N., Baneth, G., Eyal, O., van Straten, M., Harrus, S., 2012. Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine*, 31(1), 226-233.
121. Or M, Samish M, Waner T, Harrus S., 2009. Attenuation of *Ehrlichia canis* by multiple passages in two different cultures. *Clin Microbiol Infect.* 15(Suppl. 2):74–5.
122. Mahan, S., Kelly, P. J., Mahan, S. M., 2005. A preliminary study to evaluate the immune responses induced by immunization of dogs with inactivated *Ehrlichia canis* organisms. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 72(2), 119
123. Unver, A., Perez, M., Orellana, N., Huang, H., Rikihisa, Y., 2001. Molecular and Antigenic Comparison of *Ehrlichia canis* Isolates from Dogs, Ticks, and a Human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2788-2793.
124. Kjelgaard-Hansen, M., Strom, H., Mikkelsen, L. F., Eriksen, T., Jensen, A. L., Luntang-Jensen, M., 2013. Canine serum C-reactive protein as a quantitative marker of the inflammatory stimulus of aseptic elective soft tissue surgery. *Veterinary clinical pathology*, 42(3), 342-345.
125. Zwegarth E., Cabezas-Cruz A., Josemans A.I., Oosthuizen M.C., Matjila P.T., Lis K., Broniszewska M., Schöl H., Ferrolho J., Grubhoffer L., Passos LM., 2014. In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant *Ehrlichia canis* isolates. *Ticks and tick-borne diseases*. 30; 5(4): 423-31
126. Maggi, R. G., Birkenheuer, A. J., Hegarty, B. C., Bradley, J. M., Levy, M. G., Breitschwerdt, E. B., 2014. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasites & vectors*, 7(1), 127.
127. Kakoma, I., Sainz, A., Tesouro, M., Amusatogui, I, Kim, C., Biggerstaff, J., McPeak, J., Levy, M., 2000. Standardization of the Diagnostic Criteria for Canine Ehrlichiosis: Towards A Universal Case Definition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916: 396-403.
128. Gershwin, L.J., Krakowka, S., Olsen, R.G., 1995. Cytokines. In: *Immunology and Immunopathology of Domestic Animals*, 2nd ed. Mosby, St. Louis, pp. 40–46.

129. Parashar, R., Sudan, V., Jaiswal, A. K., Srivastava, A., Shanker, D., 2016. Evaluation of clinical, biochemical and haematological markers in natural infection of canine monocytic ehrlichiosis. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4), 1351-1354.
130. Sosa-Gutierrez, C. G., Quintero Martinez, M. T., Gaxiola Camacho, S. M., Cota Guajardo, S., Esteve-Gassent, M. D., Gordillo-Pérez, M. G., 2013. Frequency and clinical epidemiology of canine monocytic ehrlichiosis in dogs infested with ticks from Sinaloa, Mexico. *Journal of veterinary medicine*, 2013.
131. Frank, J. R., Breitschwerdt, E. B., 1999. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(3), 194-201.
132. Nakaghi, A. C. H., Machado, R. Z., Costa, M. T., André, M. R., Baldani, C. D., 2008. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*, 38(3), 766-770.
133. Moonarmart, W., Sungpradit, S., Rawangchue, T., Suphaphiphat, K., Suksusieng, S., Jirapattharasate, C., 2014. CLINICAL HISTORY AND HEMATOLOGICAL FINDINGS AMONG CANINES WITH MONOCYTIC EHRLICHIOSIS. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 45(1), 157.
134. Tsachev, I., Gundasheva, D., Kontos, V., Papadogiannakis, E., Denev, S., 2013. Haematological profiles in canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 31 spontaneous cases in Greece. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164(6), 327-330.
135. Gianopoulos A., Mylonakis M.E., Theodorou K., Christopher M.M., 2016. Quantitative and qualitative leukocyte abnormalities in dogs with experimental and naturally occurring acute canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Clin Pathol*, 45:281-290.
136. Frezoulis, P.S., Angelidou, E., Karnezi, D., Oikonomidis, I.L., Kritsepi-Konstantinou, M., Kasabalis, D. and Mylonakis, M.E., 2017. Canine pancytopenia in a Mediterranean region: a retrospective study of 119 cases (2005 to 2013). *Journal of Small Animal Practice*.
137. Rungsipipat, A., Oda, M., Kumposiri, N., Wangnaitham, S., Poosoonthontham, R., Komkaew, W., Suksawat, F., Ryoji, Y., 2009. Clinicopathological study of experimentally induced canine monocytic ehrlichiosis. *Comparative Clinical Pathology*, 18(1), p.13.
138. Kottadamane, M. R., Dhaliwal, P. S., Singla, L. D., Bansal, B. K., Uppal, S. K., 2017. Clinical and hematobiochemical response in canine monocytic ehrlichiosis seropositive dogs of Punjab. *Veterinary World*, 10(2), 255.

139. Ettinger J., Feldman C.: Diseases of the dog and cat. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. ETTINGER J. and FELDMAN C. (eds), 5th edition, W.B.Saunders Co., Philadelphia, 2000, pp.: 402-406.
140. Villaescusa, A., M. García-Sancho, F. Rodríguez-Franco, M. Ángel Tesouro, Á. Sainz. 2015. Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with Ehrlichia canis. The Veterinary Journal 204, no. 3, 263-268.
141. Akhtardanesh, B., Ghanbarpour, R. Blourizadeh, H., 2010. Serological evidence of canine monocytic ehrlichiosis in Iran. Comp. Clin. Path., 19: 469-474.
142. Karnezi, D., Ceron, J.J., Theodorou, K., Leontides, L., Siarkou, V.I., Martinez, S., Tvarijonaviciute, A., Harrus, S., Koutinas, C.K., Pardali, D. and Mylonakis, M.E., 2016. Acute phase protein and antioxidant responses in dogs with experimental acute monocytic ehrlichiosis treated with rifampicin. Veterinary microbiology, 184, 59-63.
143. Mylonakis, M. E., Theodorou, K. N., 2017. Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update on Diagnosis and Treatment. Acta Veterinaria, 67(3), 299-317.
144. Gaunt S., Beall M, Stillman B., Lorentzen L., Diniz P., Chandrashekar R., Breitschwerdt E., 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with Anaplasma platys and Ehrlichia canis: hematologic, serologic and molecular findings. Parasit Vectors, 3:33.
145. Perille A.L., Matus R.E., 1991. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. J Vet Intern Med; 5:195-198.
146. Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., Theodorou, K., Siarkou, V. I., Kontos, V. I., 2012. Clinical relevance of serologic testing in canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 63(2), 127-134.
147. Oliveira, D., Nishimori, C. T., Costa, M. T., Machado, R. Z., Castro, M. B., 2000. Anti-Ehrlichia canis antibodies detection by "Dot-ELISA" in naturally infected dogs. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 9(1), 1-5.
148. Sousa, K.C.M.D., André, M.R., Herrera, H.M., Andrade, G.B.D., Jusi, M.M.G., Santos, L.L.D., Barreto, W.T.G., Machado, R.Z., Oliveira, G.P.D., 2013. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for Leishmania infantum in Mato Grosso do Sul, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 22(4), 525-531.

149. Asgarali, Z., Pargass, I., Adam, J., Mutani, A., Ezeokoli, C., 2012. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to Ehrlichia canis in North Trinidad. *Ticks and tick-borne diseases*, 3(4), 207-211.
150. Solano-Gallego, L., Baneth, G., 2008. Canine leishmaniosis—a challenging zoonosis. *European Journal of Companion Animal Practice*, 18, 232-241.
151. Machado, R.Z., 2008. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for Leishmania spp., Babesia canis and Ehrlichia canis in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol*, 11, 7-11.
152. Oliveira T.M.F.S., Furuta P.I., Carvalho D., Machado R.Z., 2008. Study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for Leishmania sp., Babesia canis and Ehrlichia canis in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol Vet*; 17:7-11.
153. Стефановска J. (2011). Серопреваленца и молекуларна дијагностика на висцералната лажшманијаза кај кучињата во Република Македонија. Докторска дисертација.
154. Mekuzas, Y., Gradoni, L., Oliva, G., Foglia Manzillo, V., Baneth, G., 2009. Ehrlichia canis and Leishmania infantum co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(s2), 30-31.
155. de Caprariis D., Dantas-Torres F., Capelli G., Mencke N., Stanneck D., Breitschwerdt E.B., Otranto D., 2011. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Vet Microbiol.* 149: 206-212.
156. Llera, J. G., García, M. L., Reinoso, E. M., González, R. D. V., 2002. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*, 109(3), 185-190.
157. Cortese, L., Pelagalli, A., Piantedosi, D., Cestaro, A., Di Loria, A., Lombardi, P., Avallone, L. Ciaramella, P., 2009. Effects of therapy on haemostasis in dogs infected with Leishmania infantum, Ehrlichia canis, or both combined. *The Veterinary record*, 164(14), 433.