

Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Veterinārmedicīnas fakultāte Preklīniskais institūts
Latvia University of Agriculture
Faculty of Veterinary Medicine Preclinical Institute



INESE BĒRZIŅA

**ĒRČU PĀRNĒSĀTĀS SLIMĪBAS SUŅIEM LATVIJĀ:
ANAPLAZMOZE, BORELIOZE, BABEZIOZE**

**TICK-BORNE DISEASES IN DOGS IN LATVIA:
ANAPLASMOSIS, BORRELIOSIS, BABESIOSIS**

Promocijas darba KOPSAVILKUMS
Dr.med.vet. zinātniskā grāda iegūšanai

SUMMARY
of the Doctoral thesis for the scientific degree Dr.med.vet.

Jelgava, 2013. gads

Promocijas darbs izstrādāts ar projekta
Nr. 2009/0180/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/017/ atbalstu



Latvijas Lauksaimniecības universitāte

INESE BĒRZIŅA

**ĒRČU PĀRNĒSĀTĀS SLIMĪBAS SUŅIEM LATVIJĀ: ANAPLAZMOZE,
BORELIOZE, BABEZIOZE**

**TICK-BORNE DISEASES IN DOGS IN LATVIA: ANAPLASMOSIS,
BORRELIOSIS, BABESIOSIS**

Promocijas darba KOPSAVILKUMS
Dr.med.vet. zinātniskā grāda iegūšanai

SUMMARY
of the Doctoral thesis for the scientific degree Dr.med.vet.

**Promocijas darbs izstrādāts ar projekta
Nr. 2009/0180/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/017/ atbalstu**

Jelgava, 2013.gads

Promocijas darbs izstrādāts:

LLU VMF Preklīniskajā institūtā

Vetsuisse Fakultātē, Dzīvnieku Patoloģijas Institutā, Bernē, Šveicē

Research was carried out at:

Latvia University of Agriculture, Faculty of Veterinary Medicine,
Preclinical Institute

Vetsuisse Faculty Berne, Animal Pathology Institute, Bern, Switzerland

**Zinātniskā vadītāja
Scientific supervisor**

ACVP Dipl., Dr.med.vet., asoc. profesore

Ilze Matīse

**Oficiālie recenzenti
Official reviewers**

Dr.med.vet., asoc. profesore **Anda Valdovska**

RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas
institutā direktore, LZA īstenā locekle, Dr.med.
Modra Murovska

Igaunijas dzīvības zinātņu universitātes,
Veterinārmedicīnas un dzīvnieku zinātņu institūta
vadošais pētnieks, PhD **Brian Lassen**

Promocijas darba aizstāvēšana

2013. gada 15.novembrī plkst. 12.00, 1.
klausītavā Jelgavā, Kr. Helmaņa ielā 8.

Public defence

November 15, 2013 12.00 o'clock, 1st
auditorium, Faculty of Veterinary Medicine,
LUA.

Ar promocijas darbu var iepazīties LLU Fundamentālajā bibliotēkā.

Thesis available at the Fundamental library of LUA, Jelgavā, Lielā iela 2.

ISBN 978-9984-861-57-9 (online)

SATURA RĀDĪTĀJS

KOPSAVILKUMĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	9
ORIGINĀLO PUBLIKĀCIJU SARAKSTS	10
IEVADS	11
Darba aktualitāte un mērķis	11
Promocijas darba uzdevumi	12
Pētījuma zinātniskā novitāte	12
Pētījuma rezultātu aprobācija	13
LITERATŪRAS APSKATS	14
Latvijas ērces un tajās sastopamie slimību izraisītāji	14
Ērcu pārnēsātās slimības cilvēkiem Latvijā	14
Ērces, patogēna un saimnieka attiecības	15
Suņu granulocitārā anaplazmoze	16
Patogēnēze un klīniskā aina	16
Diagnostika	17
Ārstēšana	18
Suņu borelioze	18
Patogēnēze un klīniskā aina	18
Diagnostika	19
Ārstēšana	19
Suņu babezioze	20

Patoģenēze un klīniskā aina	21
Diagnostika	21
Ārstēšana	21
Ērču pārnēsāto slimību profilakse	22
MATERIĀLI UN METODES	23
Suņi (I-IV publikācija)	23
Aptaujas anketas (II publikācija)	24
Dati par ērču izplatību (I, III, IV publikācija)	25
Hematoloģija un seroloģija (I-IV publikācija)	25
Polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu <i>A. phagocytophilum</i> un <i>B. burgdorferi</i> s.l. noteikšanai suņu asins paraugos (I, IV publikācija)	25
Ādas biopsijas (V publikācija)	26
Polimerāzes ķēdes reakcija <i>A. phagocytophilum</i> noteikšanai formalinizētos suņu ādas paraugos (V publikācija)	26
Imūnhistoķīmija <i>A. phagocytophilum</i> noteikšanai formalinizētos suņu ādas paraugos (V publikācija)	26
Statistiskā datu apstrāde	26
REZULTĀTI UN DISKUSIJA	27
<i>A. phagocytophilum</i> un <i>B. burgdorferi</i> s.l. seroprevalence suņiem (I, III publikācija)	27
<i>A. phagocytophilum</i> un <i>B. burgdorferi</i> s.l. seroprevalenci ietekmējošie faktori	28
<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> ērču sugu izplatība (I, III publikācija)	28
Dzīvesvietas tips, ērču piesūkšanās, akaricīdu lietošana (II publikācija)	29

Ērču pārnēsātu slimību klīniskie gadījumi	30
Suņu granulocitārā anaplazmoze (I publikācija)	30
Suņu babezioze (IV publikācija)	32
<i>A. phagocytophilum</i> saistība ar ādas bojājumiem seropozitīviem suņiem (V publikācija)	34
NOBEIGUMS	37
SECINĀJUMI	37
IETEIKUMI PRAKSEI	38
LITERATŪRAS SARAKSTS	68
PIELIKUMI	78

CONTENTS

ABBREVIATIONS	39
ORIGINAL PUBLICATIONS	40
INTRODUCTION	41
Relevance and aim of the study	41
Objectives	42
Novelty of the study	42
Approbation of the results	43
LITERATURE REVIEW	44
Tick species and tick-borne pathogens in Latvia	44
Tick-borne diseases in humans in Latvia	44
Relationship among ticks, pathogens and host animal	45
Canine granulocytic anaplasmosis	46
Pathogenesis and clinical signs	46
Diagnostic methods	47
Treatment	48
Borreliosis	48
Pathogenesis and clinical signs	48
Diagnostic methods	49
Treatment	49
Babesiosis	49
Pathogenesis and clinical signs	50

Diagnostic methods	51
Treatment	51
Prophylaxis of the tick-borne diseases	51
MATERIALS AND METHODS	53
Dogs (I- IVpublication)	53
Survey (II publication)	54
Data on tick species habitat (I, III, IV publication)	55
Hematology and serology (I-IV publication)	55
Nested PCR for detection of <i>A. phagocytophilum</i> and <i>B. canis</i> in the blood samples from sick dogs (I, IV publication)	55
Skin biopsies (V publication)	55
Conventional PCR for detection of <i>A. phagocytophilum</i> in formalinized skin biopsies (V publication)	56
Immunohistochemistry for detection of <i>A. phagocytophilum</i> in formalinized skin biopsies (V publication)	56
Statistical analysis	56
RESULTS AND DISCUSSION	57
<i>A. phagocytophilum</i> and <i>B. burgdorferi</i> s.l. seroprevalence (I, III publication)	57
Factors affecting the seroprevalence of <i>A. phagocytophilum</i> and <i>B. burgdorferi</i> s.l.	58
<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> tick habitat (I, III publication)	58
Household, tick attachment, acaricide use (II publication)	59
Clinical cases of tick-borne diseases	60
Canine granulocytic anaplasmosis (I publication)	60

Babesiosis (IV publication)	62
<i>A. phagocytophilum</i> in seropositive dogs with skin lesions (V publication)	63
CLOSING REMARKS	65
CONCLUSIONS	66
RECOMMENDATIONS FOR PRACTITIONERS	66
LITERATURE	68
APPENDIX	78

KOPSAVILKUMĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

AP	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
BB	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato genogrupa
BC	<i>Babesia canis canis</i>
PQR	polimerāzes ķēdes reakcija
EDTA	etilēndiamīntetraetiķskābe
ĒPS	ērču pārnēsātās slimības
IgG, IgM	imūnglobulīns G, imūnglobulīns M
IHK	imūnhistoķīmija
IMHA	imūnmediēta hemolītiskā anēmija
IP	<i>Ixodes persulcatus</i> izplatības areāls
IR	<i>Ixodes ricinus</i> izplatības areāls
KI	konfidences intervāls 95%
M	areāls, kur sastopamas <i>I. ricinus</i> un <i>I. persulcatus</i> ērces
nPQR	polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu
PQR	konvencionālā polimerāzes ķēdes reakcija
SGA	suņu granulocitārā anaplazmoze
PSGL-1	P selektīna glikoproteīna ligands 1
RNS	ribonukleīnskābe

ORIĢINĀLO PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

Promocijas darbs balstīts uz piecām oriģinālām zinātniskām, anonīmi recenzētām publikācijām, kopsavilkuma tekstā atsaucies uz publikācijām norādītas ar romiešu cipariem no I līdz V.

- I. **I. Berzina**, V. Capligina, A. Bormane, A. Pavulina, V. Baumanis, R. Ranka, R. Granta, I. Matise. (2013) Association between *Anaplasma phagocytophilum* seroprevalence in dogs and distribution of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks in Latvia. *Ticks and Tick-borne diseases*, 4:83-88.
- II. **I. Berzina**, I. Matise. (2013) Association between the use of the acaricides, household type, tick bite and seropositivity against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinically healthy dogs in Latvia. *Environmental and Experimental Biology*, 11:47-51.
- III. **I. Berzina**, I. Matise. (2013) Seroprevalence against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and occurrence of antibody co-expression with other tick-borne diseases in dogs in Latvia. *Irish Veterinary Journal*, DOI: 10.1186/2046-0481-66-9
- IV. **I. Berzina**, V. Capligina, D. Cirule, I. Matise. (2013) Autochthonous canine babesiosis caused by *Babesia canis canis* in Latvia. *Veterinary Parasitology*, DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.03.015
- V. **I. Berzina**, C. Krudewig, C. Silaghi, I. Matise, R. Ranka, N. Müller, M. Welle. Persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection associated with skin lesions in seropositive dogs. *Ticks and Tick-borne diseases*. (2013.gada 10 jūlijā "Ticks and Tick-borne diseases" redaktoram iesniegtas atbildes uz recenzentu komentāriem).

IEVADS

Cilvēkiem Latvijā ir aktuālas vairākas ērcu pārnēsātās slimības (ĒPS) (Bormane, 2007), tomēr līdz šim tās nebija pētītas nevienai no dzīvnieku sugām Latvijā. Tā kā literatūrā tiek uzsvērts, ka bieži šo slimību izplatība ir līdzīga gan cilvēkiem, gan suņiem, izvēlējamies pētīt tieši šo dzīvnieku sugu.

Disertācijas kopsavilkumā ir apkopota promocijas darba izstrādes laikā iegūtā informācija par Latvijā sastopamajām ĒPS suņiem - suņu granulocitāro anaplazmozi, boreliozu un babeziozi.

Promocijas darbs balstīts uz publikācijām, kas kopsavilkuma tekstā ir norādītas ar romiešu cipariem (I-V). Oriģinālie raksti publicēti ar izdevēju un līdzautoru atļaujām.

Darba aktualitāte un mērķis

1927.gadā Latvijas presē ir publicēta informācija par govju babeziozi, kas ir pirmā Latvijā aktuālā ĒPS dzīvniekiem (Pakuls, 1927).

Ērcu encefalīts un Laimas slimība Latvijā atzītas par nozīmīgām ērcu pārnēsātām cilvēku infekcijas slimībām un kopš 2000. gada diagnosticēti arī cilvēku granulocitārās anaplazmozes gadījumi (Bormane et al., 2004; Ranka et al., 2004; Bormane, 2007; Süs, 2011). Līdz šim, Latvijā ĒPS dzīvniekiem nav pētītas, taču praksē veterinārārsti tās diagnosticē (Buivide – Zvīdriņa, 2009). Suņiem Latvijā ir bieža saskare ar ērcēm, bet veterinārārstiem līdz šim trūka informācijas tieši, kādas suņiem bīstamas slimības ērces Latvijā pārnēsā. Tā, kā ĒPS klīniskās pazīmes bieži vien ir nespecifiskas, tad īpaši nozīmīgi ir, ka veterinārārstiem ir pieejama lokāli iegūta informācija par Latvijā sastopamajām ĒPS (Carrade et al., 2009).

Insektu pārnēsātās slimības, to epidemioloģijas pētījumi ir aktuāli veterinārārstiem visā pasaulē (Parola un Raoult, 2001; Beal et al., 2008; Nicholson et al., 2010; Chomel, 2011; Bowman et al., 2012). Balstoties uz faktu, ka suņi ar ērcēm saskaras biežāk nekā cilvēki, lokāli iegūtu informāciju par seroprevalenci pret attiecīgām ĒPS suņiem var izmantot kā indikatoru, kas norāda, ka cilvēki konkrētajā reģionā varētu būt vairāk pakļauti ĒPS (Beal et al., 2008; Carrade et al., 2009, Day, 2011).

Sākot pētījumus, izvirzījām sekojošas hipotēzes:

- līdzīgi kā cilvēkiem, arī suņiem Latvijā ir sastopamas ĒPS – granulocitārā anaplazmoze, borelioze;

- ērcu pārnēsātas slimības biežāk novēro suņiem ar attiecīgām klīniskajām pazīmēm, kā arī suņiem, kuri biežāk saskaras ar ērcēm (medību, lauku suņi);
- seroprevalence pret ērcu pārnēsātām slimībām nav atkarīga no ērcu sugas, kura prevalē konkrētajā Latvijas reģionā;
- suņu granulocitārā anaplazmoze ir saistīta ar ādas problēmām suņiem.

Šī darba mērķi bija noteikt Latvijas suņiem sastopamo ērcu pārnēsāto slimību izplatību un to ietekmējošos faktorus, kā arī analizēt no klīniski slimiem suņiem izolētos ierosinātājus un ierosinātāju izraisītās patoloģiskās pārmaiņas.

Promocijas darba uzdevumi:

1. Suņu asins paraugu izmeklēšana uz sekojošiem ērcu pārnēsātu slimību ierosinātājiem: *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l., *Ehrlichia canis* un *Babesia* spp. klīniski veselie istabas suņiem, klīniski veselie medību suņiem un suņiem ar ērcu pārnēsātu slimību raksturīgajām klīniskajām pazīmēm.
2. Korelācijas noteikšana starp seropozitivitāti pret *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. un *I. ricinus* un *I. persulcatus* ērcu izplatību Latvijā.
3. Korelācijas noteikšana starp *A. phagocytophilum* un *B. burgdorferi* s.l. seropozitivitāti klīniski veselie suņiem un šo suņu dzīvesvietu, akaricīdu lietošanu, ziņām par ērcu piesūkšanos.
4. Analizēt ērcu pārnēsātu slimību klīniskos gadījumus suņiem Latvijā un veikt no slimajiem suņiem izolēto etioloģisko ierosinātāju molekulārbioloģisku analīzi.
5. Ar molekulārbioloģiskām un imūnhistokīmiskām metodēm noteikt *A. phagocytophilum* klātbūtni bojātas ādas biopsiju materiālā *A. phagocytophilum* seropozitīviem suņiem.

Pētījuma zinātniskā novitāte

1. Pirmais pētījums par suņu granulocitārās anaplazmozes, boreliozes un babeziozes sastopamību suņiem Latvijā.
2. Aprakstīti autohtoni suņu granulocitārās anaplazmozes un babeziozes gadījumi Latvijā, starptautiskajā GenBank datubāzē ievietotas no Latvijas suņiem izdalīto ierosinātāju gēnu sekvences.
3. Konstatēta augstāka seropozitivitāte pret *A. phagocytophilum* suņiem Latvijas reģionos, kur izplatītas *I. ricinus* ērces.
4. Konstatēti riska faktori augstākai *A. phagocytophilum* seropozitivitātei: dzīvesvieta laukos un ērcu piesūkšanās rudenī.
5. Pirmo reizi no seropozitīvu suņu ādas biopsijām izolēta *A. phagocytophilum* DNS.

Pētījuma rezultātu aprobācija starptautiskās zinātniskās konferencēs

1. I.Berzina, I. Petersons, I.Matise. Tick-borne diseases: case analysis. Research for rural development, 19-21.maijs 2010.gads, Jelgava, LLU, Latvija. (Mutiska prezentācija)
2. I.Berzina, I. Matise. Sākotnējie dati par ērcu pārnēsātu slimību sastopamību suņiem Latvijā. LLU VMF zinātniskā konference 29.oktobris. 2010.gads, Jelgava, Latvija. (Mutiska prezentācija)
3. I.Berzina, A. Bormane, I. Matise. Association between *A. phagocytophilum* in ticks and anaplasmosis in dogs in Latvia. International Meeting on Emerging Diseases (IMED), 4-7.februāris, 2011.gads, Vīne, Austrija. (Postera prezentācija)
4. I.Berzina, I.Matise. Tick-borne diseases in dogs in Latvia. International Jena Symposium on Tick-borne diseases, 24-26.marts, 2011.gads, Veimāra, Vācija. (Postera prezentācija)
5. I.Berzina, N. Müller, C. Krudewig, C. Silaghi, I.Matise, R.Ranka, M. Welle. PCR based detection of *A. phagocytophilum* DNA in paraffin embedded skin biopsies from dogs seropositive against *A. phagocytophilum*. European Society of Veterinary Clinical Pathology & International Society of Animal Clinical Pathology konference, 3-7.jūlijs, 2012.gads, Ļubļana, Slovēnija. (Mutiska prezentācija)
6. I.Berzina, I. Matise. Ērcu pārnēsātās slimības suņiem Latvijā: anaplazmoze, borelioze, babezioze. LLU VMF zinātniskā konference 22-23.novembris 2012.gads, Jelgava, Latvija. (Mutiska prezentācija)
7. I.Berzina, C. Krudewig, I.Matise, M. Welle. Histopathological changes in the skin associated with persistent canine granulocytic anaplasmosis. American College of Veterinary Internal Medicine Forum, 12-15.jūlijs, 2013, Sietla, Vašingtona, ASV. (Mutiska prezentācija).

LITERATŪRAS APSKATS

Latvijas ērces un tajās sastopamie slimību izraisītāji

Latvijā kā epidemioloģiski nozīmīgas ir aprakstītas divas Ixodidae dzimtas, Ixodes ģints ērcu sugas - *I. ricinus* un *I. persulcatus* (Bormane, 2007). Ērcu sugu izplatība Latvijā kopš 1995.gada ir samērā nemainīga *I. ricinus* ērces atrodamas Latvijas centrālajā un rietumu daļā, bet *I. persulcatus* sastopamas austrumu daļā. Starp šiem reģioniem ir vietas, kur sastopamas abu augstākminēto sugu ērces (Bormane, 2007, Karelis et al., 2012). Abu sugu ērcēs konstatēti vairāki slimību ierosinātāji, kas bīstami gan cilvēkiem, gan suņiem un citiem dzīvniekiem (1. tabula).

1. tabula

Slimību ierosinātāju prevalence Latvijas ērcēs (% inficētas/testētas) (Bormane, 2007)

Suga	AP*	BB	<i>Babesia spp*</i>
<i>I. ricinus</i>	~10% (28/289)	32.3% (40/124)	~ 10.1% (22/219) <i>B. microti</i> , <i>B. bovis</i>
<i>I. persulcatus</i>	0	34.6% (53/153)	~ 8.9% (7/78) <i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i>

*izmeklējums veikts ērcu pulos (vienā pulā 10 imago ērces)

Ērcu pārnēsātās slimības cilvēkiem Latvijā

1941.gadā vairākos Latvijas PSR preses izdevumos publicēta informācija par padomju zinātnieku neatlaidīgo darbu, meklējot cēloni bīstamai nervu slimībai, kas skar taigas medniekus, bet 1957.gadā laikrakstā “Ціпа” lasām, ka ērcu encefalīts tiek diagnosticēts arī Latvijā (Vītoļņa, 1957).

Latvijas un citu bijušā padomju bloka valstu unikālā vēsture bija pamats vairākiem pētījumiem, kas liecina, ka ērcu encefalīta izplatību cilvēkiem šajā reģionā būtiski ietekmē sociālekonomiskie faktori, piemēram, bezdarba līmenis (Godfrey un Randolph, 2011). Būtiski augstāka inficētība ar ērcu encefalītu Latvijā un Baltijas valstīs konstatēta 90-to gadu vidū, kā arī pēdējās krīzes gados (Sumilo et al., 2007; Kovalcuka et al., 2012).

Cilvēkiem Latvijā endēmiskas ir divas ērcu pārnēsātās slimības – ērcu encefalīts (morbidity uz 100 000 iedzīvotāju ir 6.2- 22.3) un Laimas slimība jeb boreliozes (morbidity 14 - 36.9 uz 100 000 cilvēkiem).

Kopš 2001. gada Latvijā diagnosticēti 26 cilvēku granulocitārās anaplazmozes gadījumi (2001. – 2010. gadu dati, A. Bormane, personīgā komunikācija).

Ērces, patogēna un saimnieka attiecības

ĒPS raksturo unikāla mijiedarbība starp patogēnu, ērci un saimnieka (suņa) organismu. Patogēni spēj izmainīt ērcu fizioloģiju (atsevišķu gēnu ekspresiju tajās) un uzvedību, lai nodrošinātu to nonākšanu uz saimnieka organisma. Savukārt, ērci piesūcoties sunim, tā izdala siekalas ar ļoti spēcīgiem imunomodulatoriem u.c. vielām, kas kavē patogēna tūlītēju iznīcināšanu un veicina tā izplatību saimnieka audos, kā arī nodrošina tā uzņemšanu citās ērcēs, kuras piesūkušās tam pašam sunim.

Suņu granulocitārās anaplazmozes (SGA), boreliozes un babeziozes izraisītāju nokļūšana suņa organismā galvenokārt notiek caur ērces kodumu. Tomēr ir arī aprakstīti babēziju un anaplazmu infekciju gadījumi, kad inficēšanās notikusi pēc citu asinsšūņu koduma, pēc asinspārlišanas, ar inficēta suņa kodumu, ar kontaminētu aprīkojumu vai transplacentāri (Carrade et al., 2009; Solano – Gallego un Baneth, 2011).

Patogēnu iekļūšanu saimnieka organismā un tā spēju izraisīt slimību ietekmē dažādi faktori – ērces piesūkšanās ilgums, patogēna aktivitāte, koncentrācija un lokalizācija ērcē, kā arī saimnieka imunitāte (Kidd et al., 2003; Granquist et al., 2010). Literatūrā minēti vairāki riska faktori saslimšanai ar ĒPS:

- gadalaiks, kad novēro augstāku nimfu (pavasārī) un pieaugušo ērcu (rudēnī) aktivitāti;
- vienlaicīga infekcija ar vairākiem ērcu pārnēsātiem patogēniem;
- patogēnus saturošo ērcu daudzums dzīvesvietas tuvumā;
- suņu izmantošana medībām vai ganīšanai;
- ērces piesūkšanās ilgums;
- suņu vecums – vidējais ar SGA slima suņa vecums ir 6-8 gadi (Carrade et al., 2009). Eksperimentālas infekcijas gadījumos, boreliozes klīniskās pazīmes biežāk novērotas kucēniem, turpretī pieaugušiem suņiem novēro serokonvertāciju bez klīniskām slimības izpausmēm (Straubinger 2011). Babeziozi biežāk diagnosticē jauniem pieaugušiem suņiem (1-4 gadi) (Solano-Gallego un Baneth, 2011);
- splenektomija – babeziozes klīniskās izpausmes ir smagākas (Hunfeld et al., 2008).

ĒPS inkubācijas periods, patogēna cirkulācija asinīs un slimības klīniskās pazīmes ir saistītas, gan ar pašu patogēnu izraisītām izmaiņām suņa organismā (babēzijas), gan ar sekundārām imūnmediētām izmaiņām (borelioze, SGA) (2.tabula).

ĒPS ierosinātāju pārnesi nepieciešamais ērces piesūkšanās laiks, slimības inkubācijas periods un cirkulācija asinīs

Patogēns	AP	BB	BC
Ērces piesūkšanās (stundas)	24-48	24- 72	48-72
Inkubācijas periods (nedēļas)	1-2	8-20*	1-3
Cirkulācija asinīs (dienas)	<28	0	30-1000^

Dati no Carrade et al., 2009; Kohn et al., 2008; Straubinger 2000; Homer et al., 2000; Ayoob et al., 2010; Kirtz, et al., 2012.

* eksperimentāli inficētiem suņiem, ^ atkarībā no šūnu un humorālās imunitātes.

Suņu granulocitārā anaplazmoze

A. phagocytophilum ir obligāta intracelulāra riketsija. Slimība diagnosticēta visā pasaulē (Egenvall et al., 2000a; Melter et al., 2007; Carrade et al., 2009; Kybicova et al., 2009; Kohn et al., 2011), bet Eiropā tā ir visplašāk izplatītā ĒPS dzīvniekiem (Stuen, 2007). Tā ir diagnosticēta plašam mājdzīvnieku (liellopi, zirgi, suņi, aitas) lokam, kamēr dažādi savvaļas dzīvnieki (sīkie grauzēji, brieži un iespējams arī putni) kalpo kā AP rezervuārs (Billeter et al., 2007; Stuen, 2007; Carrade et al., 2009).

Kopš 2001. gada, pamatojoties uz molekulār-bioloģiskiem pētījumiem par 16S ribosomālās RNS, groESL un citu gēnu struktūru, ar AP saprot agrāk trīs atsevišķi izdalītas riketsiju sugas: *Ehrlichia equi*, *E. phagocytophila* un cilvēku granulocitārās anaplazmozes ierosinātāju (Dumler et al., 2001).

Eiropā galvenās AP pārnesējas ir *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) ērces, bet *I. persulcatus* ērces tiek uzskatītas par galvenajām anaplazmu pārnesējām Āzijā (Carrade et al., 2009; Paulauskas et al., 2009). Abas iepriekšminētās ērcu sugas ir sastopamas Latvijā (Bormane et al., 2004, Karelis et al., 2012), bet *A. phagocytophilum* līdz šim ir konstatētas tikai *I. ricinus* ērcēs (Bormane, 2007). Tāpēc mūsu pētījumā izvirzījām uzdevumu, noskaidrot ne tikai AP seroprevalenci, bet arī tās saistību ar Latvijā izplatītajām ērcu sugām. Suņi, tāpat kā cilvēki, ir nejauši AP saimnieki un tie nav nozīmīgi anaplazmu tālākā izplatīšanā, jo bakterēmija ir īsa (2. tabula).

Patogēnēze un klīniskā aina

Anaplazmozes patogēnēze nav pilnībā skaidra (Carrade et al., 2009). In vitro pētījumos noskaidrots, ka iekļūšanai šūnās AP izmanto PSGL-1 un citus neitrofilu virsmas proteīnus, kas nodrošina kaveolu mediētu endocitozi un pasargā anaplazmas no nokļūšanas fagolizosomās. Kaveolas ir proteīniem un lipīdiem bagāti reģioni šūnu citoplazmatiskajā membrānā, kas veic signalizācijas funkcijas. Izmantojot Anka proteīnu, kas saimnieka šūnas kodolā izmaina saimnieka šūnas gēnu regulāciju, AP aktīvi izmaina inficētās šūnas iekšējo vidi, inhibējot superoksīda

ražošanu, mazinot fagocitozes spējas, kavējot apoptozi un mazinot neitrofilu kustīgumu, tādējādi traucējot to migrāciju uz audiem.

AP inficē ne tikai neitrofilos leukocītus, bet arī CD34 saturošas šūnas kaulu smadzenēs (megakariocītu līnijas šūnas, endotēlija šūnas), kam iespējams ir nozīme infekcijas saglabāšanā (persistencē), kā arī infekcijas pārvešanā no šūnas uz šūnu. Inficēto šūnu citoplazmā notiek riketsiju vairošanās dalties un veidojas baktēriju kolonijas – morulas (Kohn et al., 2008).

Akūta SGA parasti ir asimptomātiska vai saistīta ar nespēcificiskām klīniskām pazīmēm: drudzis, letarģija, apetītes trūkums, locītavu sāpēm (Melter et al., 2007; Carrade et al., 2009; Granick et al., 2009). Visizplatītākās laboratoriski konstatētās novirzes ir trombocitopēnija, anēmija un paaugstināta aknu fermentu aktivitāte (Carrade et al., 2009). Pētījumos ar eksperimentāli inficētiem jēriem noskaidrots, ka atsevišķi anaplazmu celmi izraisa smagāku klīnisku saslimšanu, bet attiecībā uz SGA šādu datu trūkst (Stuen et al., 2003; Poitout et al., 2005; Morissette et al., 2009; Canelas Domingos et al., 2011; Kohn et al., 2011).

Suņiem, jēriem, zirgiem un govīm konstatēta arī persistenta granulocitārā anaplazmoze (Pusterla et al., 1997; Egenvall et al., 2000b; Stuen et al., 2008; Franzen et al., 2009; Granquist et al., 2010). Šāda diagnoze tiek noteikta balstoties uz pozitīvu PQR reakciju un atkārtotu riketsēmiju (Stuen et al., 2008). Klīniskās pazīmes nenovēro, vai arī tās ir ļoti vieglas. Riketsiju persistence organismā ir pētīta vairākos eksperimentālos pētījumos un āda ir minēta kā potenciāla riketsiju persistence vieta (Granquist et al., 2010). Mikroskopiski izmeklējot, audus, kas iegūti no eksperimentāli un dabīgā ceļā inficētiem jēriem, noskaidrots, ka ērces piesūksšanās vietā AP infekcija ādā saistīta ar epidermas hiperplāziju un iekaisuma šūnu infiltrātiem dermā (Granquist et al., 2010). Tādēļ mēs izvēlējamies pētīt suņu ādas biopsiju materiālu, lai noskaidrotu vai ādas bojājumi suņiem varētu būt saistīti ar *A. phagocytophilum* persistenci.

Diagnostika

SGA diagnozi iesaka balstīt uz vairākiem parametriem:

- morulas neitrofilajos leukocītos;
- atkārtotā seroloģiskā testā augošs antivielu titrs;
- pozitīva PQR reakcija (asinīs);
- klīniskās pazīmes un laboratoriskās izmaiņas – letarģija, anoreksija, sāpīgas locītavas, drudzis, nezināmas izcelsmes trombocitopēnija, anēmija (Carrade et al., 2009; Ravnik et al., 2011).

Visbiežāk izmantotā diagnostikas metode ir asins uztriepju mikroskopiska izmeklēšana un morulu identificēšana neitrofilajos leukocītos. Tomēr jāņem vērā, ka AP un *E.canis* veidotās morulas morfoloģiski nav atšķiramas, bez tam, riketsēmija SGA gadījumos ir relatīvi īsa (<28 dienas) (Melter et al., 2007; Granick et al., 2009;

Canelas Domingos et al., 2011). Tādēļ diagnozes apstiprināšanai lieto PQR un/vai seroloģiju. Molekulāra AP diagnostika visbiežāk balstīta uz 16S ribosomālās RNS kodējošā gēna fragmentu amplificēšanu. (Kybicova et al., 2009; Canelas Domingos et al., 2011). PQR konstatē AP nukleīnskābes esamību asinīs vai audos, bet ar tās palīdzību nevar noteikt vai riketsijas ir dzīvotspējīgas vai nē. Tādēļ ir svarīgi novērtēt arī klīniskās pazīmes.

Seroloģiski parasti nosaka IgG klases antivielas, kuras akūtas infekcijas gadījumā (< 8 dienas pēc inficēšanās) var nebūt pietiekamā daudzumā. Pēc pārslimošanas antivielas saglabājas apmēram 6-8 mēnešus, tādēļ, vēl jo nozīmīgāk, ir veikt atkārtotus seroloģiskos testus: SGA gadījumā novēro vismaz 4x paaugstinātu antivielu titru (Carrade et al., 2009).

Literatūrā aprakstītie kritēriji SGA diagnosticēšanai tika ņemti vērā mūsu pētījuma ietvaros izmeklētajiem suņiem.

Ārstēšana

SGA ārstēšanai visbiežāk izmanto doksiciklīnu 5mg/kg katras 12 stundas 2 nedēļas pēc kārtas per os. Klīniskā stāvokļa uzlabošanās ir sagaidāma apmēram diennakts laikā pēc ārstēšanas uzsākšanas (Carrade et al., 2009).

Suņu borelioze

Latvijā cilvēkiem boreliozes ierosinātājas ir vairāku sugu borēlijas, kas apvienotas genogrūpā *B.burgdorferi* sensu lato (BB) (Ranka et al. 2004). BB ir spirohetas – kustīgas, šauras, garas spirālveida baktērijas. To garums variē no 15-30 μm un platums no 0.2-0.3 μm (Straubinger 2000). Borelioze ir konstatēta suņiem, kaķiem, zirgiem un liellopiem. Visbīstamākās šīs infekcijas pārnēsējas suņiem un cilvēkiem ir pieaugušās ērces. Tomēr, līdzīgi kā AP gadījumā, suņiem un cilvēkiem nav nozīmīgas lomas borēliju izplatīšanā, jo ērces borēlijas biežāk iegūst no sīkajiem grauzējiem vai putniem.

Interesanti, ka valstīs, kurās cilvēki slimo ar boreliozī samērā bieži, piemēram Zviedrijā un ASV, BB seroprevalence suņiem ir pārsteidzoši zema, pie tam klīniski saslimšanas gadījumi suņiem tiek diagnosticēti vēl retāk (Egenvall et al., 2000a; Pejchalova et al., 2006; Pantchev et al., 2009; Kovalcuka et al., 2011).

Latvijā BB konstatētas, gan *I. ricinus*, gan *I. persulcatus* ērcēs, un borelioze tiek bieži diagnosticēta cilvēkiem visā valsts teritorijā (Bormane, 2007, Ranka et al., 2004), tādēļ viens no mūsu pētījuma uzdevumiem bija noskaidrot suņu seroprevalenci pret BB un tās saistību ar Latvijā izplatītajām ērcu sugām.

Patogēnēze un klīniskā aina

Ērcei piesūcoties un uzņemot asinis, izmainās tās iekšējā temperatūra. Tiek uzskatīts, ka šīs izmaiņas aktivizē viduszarnā esošās borēlijas, kas migrē caur zarnu

epitēliju un ar hemolifmu nokļūst ērces siekalu dziedzeros, no kurienes tās nokļūst zīdītāja organismā. Ērces koduma vietā notiek borēliju vairošanās un sākas to migrācija uz audiem (Bormane, 2007), detalizēta informācija par inkubācijas periodu norādīta 2.tabulā.

Dabīgi inficētiem suņiem borelioze var izpausties kā artrīts, samazināta ēstgriba un drudzis (Skotarczak et al., 2003). Retāk tiek novērotas nieru, sirds un neiroloģiskas problēmas (Agudelo et al., 2011). Eksperimentāli inficētiem suņiem līdz šim vienīgā novērotā klīniskā pārmaiņa ir artrīts (Halperin, 2011; Straubinger, 2011).

Svarīgi pieminēt, ka lielākā daļa dabīgi inficēto suņu pašizārstējas un klīniski nesaslimst; klīniskās izpausmes veicinošie faktori nav zināmi (Straubinger, 2011). Tomēr retumis novērojamā boreliozes nefropātija ir ātri progresējoša un letāla (Gerber et al., 2007, Gerber et al., 2009). Boreliozes nefropātijai raksturīgs imūnmediēts glomerulonefrīts, limfoplazmacitārs intersticiāls nefrīts, un nieru kanāliņu nekroze ar reģenerāciju. Boreliozes nefropātijas klīniskā aina saistīta ar nieru mazspēju un tai raksturīgām pazīmēm – dehidratāciju, vemšanu, letargiju, poliūriju, polidipsiju, svara zudumu. Boreliozes sirds forma ir ļoti reta un saistīta ar impulsu vadīšanas anomālijām, bradikardiju. Neiroloģiskajai slimības formai raksturīga sejas paralīze, krampji, agresija. Eritema migrans (ādas izsitumi, kurus novēro 50% gadījumu ar boreliozī inficētiem cilvēkiem) suņiem nenovēro (Straubinger 2000, Bormane, 2007).

Diagnostika

Diagnozes noteikšana ir sarežģīta, jo klīniskās pazīmes ir nespecifiskas. Papildus klīniskās ainas un epidemioloģiskās situācijas novērtēšanai visbiežāk veiktie izmeklējumi boreliozes diagnostikai ir pilna asinsaina, asins bioķīmija, seroloģija, urīna analīzes, rentgenoloģiska izmeklēšana un locītavu šķidrumu izmeklēšana. Jāņem vērā, ka antivielu konstatēšana serumā nenozīmē aktīvu infekciju, bet var būt saistīta ar vakcināciju pret boreliozī. Lai gan borēlijas un antivielas pret tām persistē organismā pat vairākus gadus, aktīva imunitāte pēc pārslimošanas ir īslaicīga (Straubinger 2000). Izvēloties seroloģisko testu, jāņem vērā, ka tikai C6 antigēnu nosakošie testi ir specifiski dabīgai infekcijai un tie nereaģē ar vakcinācijas radītajiem antigēniem. Mūsu izvēlētais seroloģiskais tests (IDEXX Canine SNAP 4Dx test) ir viens no C6 nosakošajiem testiem.

Tā kā boreliozes klīniskās izpausmes atgādina SGA klīniskās pazīmes, tad pētījuma mērķiem suņus ar attiecīgajām klīniskajām pazīmēm apvienojām vienā, slimo suņu grupā.

Ārstēšana

Boreliozes klīnisko pazīmju samazināšanai iesaka lietot antibiotikas no tetraciklīnu grupas (piemēram, doksiciklīnu), penicilīnu grupas (piemēram,

amoksicilīnu, ceftriaksonu), vai makrolīdu grupas (piemēram, azitoromicīnu), tomēr nevienas no šīm antibiotikām nenodrošina pilnīgu borēliju iznīcināšanu suņa organismā (OIE). Lēnās borēliju vairošanās dēļ antibiotiku kursu iesaka turpināt 3-4 nedēļas. Nereti nepieciešama arī simptomātiska ārstēšana ar kortikosteroīdiem, pretiekaisuma līdzekļiem, omega-3 taukskābēm, diētas modificēšanu u.c. Tomēr kortikosteroīdi jāpielieto uzmanīgi, jo ir aprakstīti gadījumi, kad prednizolona lietošanas laikā rodas akūts boreliozes recidīvs (Straubinger, 2000).

Suņu babezioze

Babēzijas ir babēziju ģintij piederoši vienšūņi, kas inficē eritrocītus (Hunfeld et al., 2008; Ayoob et al., 2011; Solano – Gallego un Baneth, 2011). Atkarībā no izmēra babēzijas iedala lielajās (2.5-5.0µm) un mazajās (1.0-2.5µm). Suņiem Eiropā saslimšanu visbiežāk izraisa lielās babēzijas – *B. canis canis* (BC), *B. canis vogeli*, *B. canis gibsoni*.

Līdz mūsu pētījuma uzsākšanai 2009.gadā veterinārārsti no vairākām Latvijas klīnikām bija ziņojuši par babeziozes gadījumiem suņiem, tomēr nebija skaidrs, vai suņi inficējušies Latvijā un kādas babēziju sugas izraisīja saslimšanu (Buivide-Zvīdriņa, 2009). Patogēno babēziju sugu diferencēšanai ir īpaša nozīme, jo pēdējos gados, pateicoties molekulārbioloģiskām metodēm tiek konstatētas arvien jaunas patogēnas babēziju sugas, jaunos ģeogrāfiskos reģionos (Hunfeld et al., 2008; Ōines et al., 2010). BC izraisīta babezioze ir aprakstīta Krievijā, Norvēģijā, Polijā, Vācijā, Nīderlandē, kā arī vairākās Dienvideiropas valstīs (Solano – Gallego un Baneth, 2011, Ōines et al., 2010; Adaszek et al., 2011). Pārējās divas lielo babēziju sugas pārsvarā lokalizētas dienvidos, kur atrodas tās pārnēsājošo ērcu izplatības areāli (Solano – Gallego un Baneth, 2011).

Izmeklējot ērces Latvijā konstatētas sekojošas babēziju sugas – *I. persulcatus* ērcēs – *B. divergens*, kas īpaši patogēna cilvēkiem; *I. ricinus* ērcēs – *B. bovis*; bet *B. microti* izolēta no abu sugu ērcēm (Bormane, 2007). *Babesia canis canis* līdz šim nav konstatēta nevienā no Latvijā izmeklētajām ērcēm (Bormane, 2007).

Babēziju dzīves cikls ir labi izpētīts - ērces asinsmaltīte aktivizē babēziju sporozoītus, kuri ar ērces siekalām nokļūst sunī. Sporozoīti caur eritrocītu membrānām iekļūst citoplazmā un attīstās par trofozoītiem. Eritrocītā notiek parazitā dalīšanās un merozoītu veidošanās – šī tipiskā bumbiurveida forma ir viegli konstatējama izmeklējot asins uztriepes ar gaismas mikroskopu (Hunfeld, et al., 2008; Ayoob et al., 2010). Detalizēta informācija par babēziju pārnesei nepieciešamo ērces piesūkšanās ilgumu, slimības inkubācijas periodu un parazitā cirkulāciju asinīs atrodama 2.tabulā. Ērces, sūcot asinis, uzsūc arī babēziju merozoītus un ērcē notiek sporogonija, pēc kuras parazitā sasniedz ērces siekalu dziedzerus un oocītus. Babēziju attīstība saimnieka organismā notiek tikai eritrocītu iekšienē (Ayoob, et al., 2010).

Patoģenēze un klīniskā aina

Babeziozes patoģenēze ir atkarīga no babēziju sugas un saimnieka imūnsistēmas stāvokļa. *B. canis rossi* izraisītie gadījumi ir smagāki nekā *B. canis vogeli* un BC izraisītie. Babeziozes klīniskās pazīmes saistītas ar hemolītisko anēmiju un sistēmiskā iekaisuma reakcijas sindromu, kas var radīt parenhimatozo orgānu funkcionālus bojājumus (Solano – Gallego un Baneth, 2011).

Hemolītiskās anēmijas cēloņi babeziozes gadījumā ir vairāki:

- mehāniski, babēziju izraisīti eritrocītu membrānas bojājumi;
- antieritrocītu antivielu veidošanās, komplementa saistīšanas reakcija un tai sekojošā eritrocītu līze;
- eritrocītu vielmaiņas traucējumi, kas noved pie samazinātas to membrānas izturības (Solano – Gallego un Baneth, 2011).

Nozīmīga loma babeziozes patoģenēzē ir audu hipoksijai, kas rodas saistībā ar anēmiju, hipotensīvo šoku, asins stāzi, ogļskābās gāzes pārprodukciju (Ayoob, et al., 2010).

Babeziozes klīniskā aina variē no vieglas līdz smagai un tā nekorelē ar parazitērijas smagumu. Babēziju izraisītā hemolītiskā anēmija klīniski izpaužas kā drudzis, bālums, anoreksija, nomākums, splenomegālija, tahikardija (Solano – Gallego un Baneth, 2011). Lielākajai daļai slimo suņu, veicot laboratorisku asiņu un seruma izmeklēšanu, novēro arī trombocitopēniju, hiperfibrinogenēmiju, vieglu līdz vidēji smagu neregeneratīvu anēmiju, hemolīzi, neitropēniju, hemoglobīnūriju (Kirtz et al., 2012; Ayoob et al., 2010).

Diagnostika

Visbiežāk praksē izmanto tiešu diagnostikas metodi – babēziju mikroskopisku vizualizāciju perifēro asiņu uztriepē (Ayoob et al., 2010). Šīs metode ir specifiska, bet tās jutība ir zema, ja inficēto eritrocītu skaits ir zems. Būtiski veikt pilnu hematoloģisko izmeklēšanu (Kirtz et al., 2012). Kā minēts publicētajā zinātniskajā literatūrā, izmantojot molekulārbioloģijas metodes var vieglāk uzstādīt diagnozi zemas parazitērijas gadījumos, kā arī atšķirt atsevišķas lielo babēziju sugas, kas morfoloģiski nav iespējams (Kirtz et al., 2012). Arī mēs savā darbā izmantojam gan tiešu babēziju diagnostiku mikroskopējot asins uztriepes, gan veicām no asinīm izdalīto babēziju molekulārbioloģisku analīzi.

Ārstēšana

BC izraisītas babeziozes ārstēšanai iesaka vienreizēju imidokarba dipropionāta devu 5-6.6 mg/kg intramuskulāri, injekciju var atkārtot pēc 14 dienām. Pēc ārstēšanas uzsākšanas klīniskās pazīmes parasti mazinās diennakts laikā. Bieži papildus specifiskai ārstēšanai jālieto arī simptomātiska ārstēšana – īpaši nozīmīga ir šķīdumu terapija, asins pārliešana, pretiekaisuma līdzekļu lietošana. Gadījumos, kad

specifiskai ārstēšanai nav rezultātu, jāizslēdz IMHA iespējamība. Vieglas slimības formas gadījumos var notikt pašizārstēšanās (Ayoob et al., 2010).

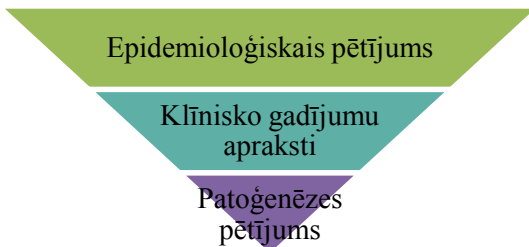
ĒPS profilakse suņiem

ĒPS profilakses nolūkos jāveic dažādi pasākumi, gan apkārtējās vides izmaiņas, gan suņu apstrāde ar akaricīdiem preperātiem, kā arī piesūkušos ērcu pēc iespējas ātrāka noņemšana (Straubinger, 2000; Foil et al., 2004; Randolph 2010). Ērcu optimālai attīstībai nozīmīgi ir vairāki apkārtējās vides faktori: mazo savvaļas zīdītāju skaits, kuri izbaro ērcu jaunākās attīstības stadijas (kāpurus un nimfas) kā arī apkārtējās vides temperatūra un mitrums. Līdz ar to tiek uzskatīts, ka strādājošiem (piemēram, medību, robežsardzes u.c.) vai laukos dzīvojošiem suņiem ir augstāks risks saslimt ar ĒPS (Rand et al., 1991; Krupka et al., 2007; Carrade et al., 2009; Wu et al., 2009). Bieži vides faktoru ietekmes noskaidrošanai tiek izmantota saimnieku anketēšana ar paralēli ievāktu suņu asins paraugu izmeklēšanu. Arī mēs izvēlējamies izmantot abas šīs metodes, kaut arī tām piemīt trūkumi – piemēram, dzīvnieku īpašnieki nezin tieši kādus preperātus lieto ērcu atbaidīšanai vai nogalināšanai, piesūkušās ērces suņa kažokā ir grūti pamanīt u.c. (Wu et al., 2009; Kohn et al., 2011). Vakcinācija pret ĒPS tiek vērtēta neviennozīmīgi, tomēr tiek veikts aktīvs pētnieciskais darbs vakcīnu radīšanai (Straubinger 2000; Schuijt et al., 2011).

MATERIĀLI UN METODEDES

Pētījumā izmantotā metodoloģija tika saskaņota ar Pārtikas un Veterinārā Departamenta Ētikas Padomi. Sīkāka informācija par izmantotajiem reaģentiem un laboratorijas protokoliem atspoguļota pielikumā Nr. 1.

Promocijas darba shēma attēlota 1. attēlā.



1. att. Promocijas darba shēma.

Promocijas darbs sastāv no trīs daļām - visplašākā ir epidemioloģiskā daļa, no kuras rezultātiem vadījāmieš veicot padziļinātus pētījumus par ērcu pārnēsātu slimību klīniskajām izpausmēm un patoģenēzi.

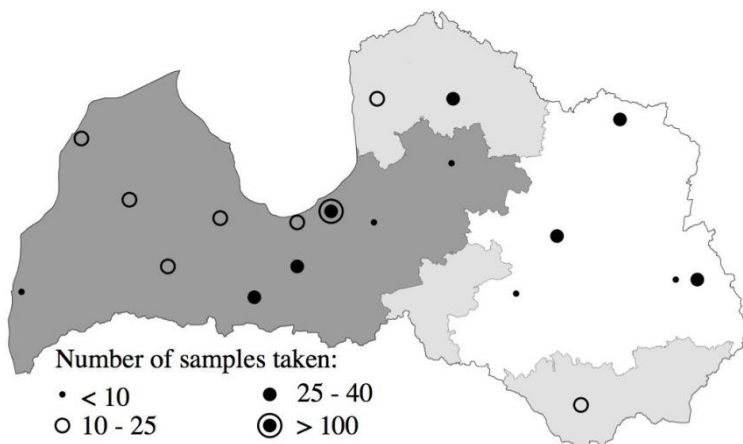
Materiālu un metožu sadaļā vispirms aprakstītas metodes un materiāli, kas izmantoti epidemioloģiskā pētījuma veikšanai, tālāk aprakstītas metodes un materiāli, kas pielietoti Latvijas suņiem diagnosticēto ērcu pārnēsāto slimību klīnisko gadījumu analīzei (I – IV publikācijas). Materiālu un metožu sadaļas nobeigumā aprakstītas metodes, kas tika izmantotas *A. phagocytophilum* patoģenēzes pētījumam (V publikācija).

Suņi (I-IV publikācijas)

Pētījuma epidemioloģiskajā un klīniskajā daļā iekļauti 473 Latvijā dzīvojoši suņi, kas pētījuma vajadzībām tika sadalīti sekojošās grupās:

- klīniski veseli istabas suņi (n=400);
- klīniski veseli medību suņi (n=41);
- suņi ar SGA/boreliozes klīniskajām pazīmēm (n=29). Šajā grupā iekļauti suņi, kuriem novēroja sekojošās klīniskās pazīmes un laboratorijas testu izmaiņas - drudzis, letarģiju, anoreksiju, sāpes locītavās, klibumu, anēmiju, trombocitopēniju;
- suņi, kuriem laboratoriski diagnosticēta babezioze un kuri pēdējos 6 mēnešus nav bijuši ārpus Latvijas teritorijas (n=3). Informāciju par šiem

suņiem, kā arī asins paraugus mūsu pētījumam nepieciešamajiem testiem ieguvām sadarbojoties ar veterinārajām klīnikām un laboratorijām Latvijā. Paraugu ņemšanas vietas un paraugu skaits attēlots 2. attēlā.



2. att.. Pētījumā izmantoto suņu asins paraugu ņemšanas vietas (ērču izplatības dati no A. Bormane, 2007).

Kartē tumši pelēka- *I. ricinus*, balta -*I. persulcatus* izplatības zona, gaiši pelēkajos reģionos sastop abu sugu ērces. Ar punktiem atzīmētas paraugu ņemšanas vietas un paņemto paraugu skaits.

Klīniski veseli suņi tika piesaistīti pētījumam veterinārajās klīnikās un izbraukumos Latvijas pagastos. Asins paraugu ņemšanu no klīniski veseliem istabas un mēdību suņiem veicām gan laukos (n=321/441), gan pilsētās (n=120/441) un trīs dažādos ērcu izplatības reģionos Latvijā (2. attēls).

Sadarbībā ar vairākām veterinārajām klīnikām Latvijā tika iegūti paraugi no suņiem ar ĒPS klīniskajām pazīmēm. Pētījumā iekļauti dažādu vecumu, šķirņu un abu dzimumu, gan pilsētās gan laukos dzīvojoši suņi.

Aptaujas anketas (II publikācija)

Pētījumā iekļauto klīniski veselo istabas un mēdību suņu saimnieki (n=400) aizpildīja aptaujas anketas (2.pielikums). Anketu dati tika izmantoti, lai noskaidrotu mūsu iepriekš noteiktās *A. phagocytophilum* un *B. burgdorferi* s.l. seropozitivitātes saistību ar sekojošiem faktoriem:

- dzīvesvieta – lauki vai pilsēta;
- suņu skaits mājsaimniecībā;
- suņu apstrāde ar akaricīdiem (jā/nē, kādi līdzekļi, cik bieža apstrāde);

- ērcu piesūkšanās (jā/nē, daudzums vienā reizē, gadalaiks, kad novēro vairāk piesūkušos ērcu).

Dati par ērcu izplatību Latvijā (I, III, IV publikācijas)

Dati par Latvijā sastopamajām ērcu sugām un to izplatību tika iegūti no Dr. A. Bormanē disertācijas “*Ixodes ricinus* L. un *Ixodes persulcatus* P.Sch. (Acari: Ixodidae) izplatība, to pārnēsāto infekcijas slimību nozīme un molekulārā epidemioloģija Latvijā” (Bormane, 2007). Atkarībā no ērcu sugu izplatības izdalījām trīs Latvijas reģionus, kuros attiecīgi bija izplatītas galvenokārt *I. ricinus*, (IR) *I. persulcatus* (IP) vai abu minēto sugu ērces (M). Klīniski veselo suņu asins paraugu ņemšana tika plānota, iekļaujot trīs augstākminētos reģionus: IR reģionā (n= 272), IP reģionā (n=93), M reģionā (n=76).

Hematoloģija un seroloģija (I-IV publikācijas)

Suņiem (n=473) tika ņemti 2-5 ml venozo asiņu antikoagulantu EDTA saturošos stobriņos. Uzreiz pēc asins parauga ņemšanas tika pagatavota asins uztriepe (žāvēta gaisā, krāsota ar modificētu Wrights Giemsa krāsu).

Ar asins analizatoru tika noteikts kopējais leikocītu, eritrocītu un trombocītu skaits. Mikroskopiski izmeklējot asins uztriepes, tika novērtēta šūnu morfoloģija (200 leikocītu diferenciālformula), asins šūnu parazitā un morulu klātbūtne, inficēto šūnu procentuālais daudzums.

Seroloģiskā izmeklēšana tika veikta visiem pētījumā iekļautajiem suņiem (n=473), EDTA stabilizētās asinīs ar SNAP 4Dx testu, izmantojot, ražotāja ieteikto metodoloģiju. Šis cietfāzes enzīmu imūnsorbences jeb ELISA tests nosaka IgG un IgM pret AP virsmas proteīnu p44/msp2, *Ehrlichia canis* proteīnus p30 un p30-1, kā arī BB C6 peptīdu. Tests nosaka arī *Dirofilaria immitis* antigēnu. Izmantotā testa jutība un specifiskums ir augsti pret visiem patogēniem (Beall et al., 2008; Pantchev et al., 2009; Chandrashekar et al., 2010; Couto et al., 2010; Carrade et al., 2011).

Polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu *A. phagocytophilum* un *B. canis canis* noteikšanai suņu asins paraugos (I, IV publikācija)

Pētījumā iekļauto suņu perifērās asinis, etioloģiskās diagnozes precizēšanai, izmeklējām ar polimerāzes ķēdes reakciju ar iekšējo praimēšanu (nPKR). Ar šo metodi tika izmeklēti klīniski slimie suņi ar sekojošām laboratorisko parametru izmaiņām:

- AP 16S rRNS gēna amplificēšana veikta suņiem ar trombocitopēniju (trombocītu skaits $<50 \times 10^9/L$) un vai morulām neitrofilajos leikocītos (n=10);
- BC 18S rRNS gēna amplifikācija suņiem, kuriem mikroskopiski konstatētas babēzijas eritrocītos (n=3).

Veikta arī amplificēto materiālu sekvenēšana un sekvenču salīdzināšana ar datubankā (GenBank) pieejamajām un zinātniskajā literatūrā publicētajām AP un BC sekvencēm.

Ādas biopsijas (V publikācija)

Lai paplašinātu izpratni par patoģenēzi un noteiktu, vai AP var persistēt un izraisīt pārmaiņas ādā, izmantotām suņu ādas biopsijas (n=65) no arhīva Vetsuisse Fakultātes Bernē, Šveicē. Biopsijas iegūtas no sekojošām suņu grupām:

- Suņi ar klīniskām ādas problēmām un zināmu seroloģisku statusu:
 - seropozitīvi, pozitīvi reaģēja uz ārstēšanu ar doksiciklīnu, histoloģiski ādas bojājumu iemesls nav atrasts (52 biopsijas no 12 suņiem)
 - seronegatīvi, pozitīvi reaģēja uz ārstēšanu ar doksiciklīnu, histoloģiski ādas bojājumu iemesls nav atrasts (2 biopsijas no 2 suņiem)
- Suņi ar tipiskām makroskopiskām un histoloģiskām ērcu koduma pazīmēm ādas biopsijās, seropozitivitātes statuss nav zināms (11 biopsijas no 10 suņiem).

Polimerāzes ķēdes reakcija *A. phagocytophilum* noteikšanai formalinizētos suņu ādas paraugos (V publikācija)

Polimerāzes ķēdes reakcija (PĶR) tika pielietota, lai pētītu AP saistību ar ādas bojājumiem seropozitīviem suņiem to ādas biopsiju materiālā (metodes apraksts pirmajā pielikumā). Pētījumā izdalītās slimību ierosinātāju gēnu sekvences tika salīdzinātas ar Gēnu bankā pieejamajām sekvencēm.

Imūnhistoķīmija *A. phagocytophilum* noteikšanai formalinizētos suņu ādas paraugos (V publikācija)

Metode tika pielietota, lai pierādītu AP lokalizācijas vietu, AP seropozitīvu un PĶR pozitīvu suņu ādas biopsiju materiālā (n=8). Tika izmantotas monoklonālā (peles-anti-MSP2) un poliklonālā (truša – anti- *A. phagocytophilum*) antivielas un 3- amino-9-etilkarbazola substrāts (AEC) antivielu-antigēna kompleksa noteikšanai.

Statistiskā datu apstrāde

Statistisko datu apstrādi veicām ar NCSS programmatūru (NCSS, 2007, Jūta, ASV). Ņemot vērā tuvākajās valstīs konstatēto ĒPS seroprevalenci, suņu skaitu Latvijā un iespējamo ĒPS prevalenci Latvijā noteicām, ka n=441 ir adekvāts izmeklējumu skaits, lai iegūtie dati būtu statistiski ticami un atainotu pētāmo slimību seroprevalenci.

Datu analīzē pielietoti parametriskie testi (Stjūdenta tests) un neparametriskie testi (mediāna un amplitūda, Manna-Vitneja U tests, Fišera tiešais tests, krusteniskā attiecība ar 95% KI). Statistiska nozīmība konstatēta, ja $p < 0.05$.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Anaplasma phagocytophilum un *B. burgdorferi* s.l. seroprevalence suņiem (I, III publikācija)

Pētījuma rezultāti liecina, ka Latvijas suņi ir saskārušies gan ar AP, gan BB, jo konstatējām antivielas pret abiem šiem ierosinātajiem (3. tabula). Salīdzinoši augstā AP seroprevalence (11%) liecina, ka AP infekcija ir samērā bieži sastopama Latvijas suņu populācijā. Konstatējām, ka AP seroprevalence nav būtiski augstāka suņiem, kam ir SGA/boreliozes klīniskās pazīmes ($p>0.05$) un ka klīniski veselie medību suņiem seropozitivitāte nav augstāka salīdzinot ar klīniski veselie istabas suņiem ($p=0.833$).

3. tabula

Latvijas suņu seroprevalence pret *A. phagocytophilum* un *B. burgdorferi* s.l.

	Klīniski veseli (n=441)		Slimi (n=29)
	istabas (n=400)	medību (n=41)	
AP	11% (44)	12.2% (5)	17.2% (5)
BB	2.7% (11)	0% (0)	0% (0)

Klīniski veselie suņi konstatētā AP seropozitivitāte Latvijā ir līdzīga tuvākajās valstīs aprakstītajai: Zviedrijā ir 17%, bet Polijā 21% seropozitīvu suņu (Egenvall et al., 2000a; Engvall un Egenvall 2002; Welc-Faleciak et al., 2009). Statistiski nozīmīgas atšķirības trūkums seropozitivitātē starp veselo un slimo suņu grupām ir konstatēts arī citu pētnieku darbos (Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2011) un tiek skaidrots ar antivielu ilgstošu saglabāšanos pēc anaplazmozes pārslimošanas, kā arī ar faktu, ka slimo suņu grupā varēja tikt iekļauti akūti slimi suņi, kuriem antivielas vēl bija zem izmantotā testa nosakāmības robežas (Carrade et al., 2011; Egenvall et al., 2000a; Pantchev et al., 2009; Rand et al., 2011; Poitout et al., 2005). Slimos suņus, kuriem konstatējām trombocitopēniju, izmeklējām ar PQR (n=10). Šis tests bija pozitīvs tikai vienam klīniski slimam sunim, kuram neitrofilajos leukocītos tika konstatētas morulas. Tā kā nevienam citam sunim ar trombocitopēniju PQR tests nebija pozitīvs tad uzskatām, ka mūsu pielietotā seroloģiskā testa rezultāti slimo suņu grupā ir ticami un AP seroprevalence nav augstāka klīniski slimiem suņiem salīdzinājumā ar klīniski veselajiem.

Trešajā tabulā atspoguļotie BB seropozitivitātes rādītāji ir negaidīti zemi, ņemot vērā augsto cilvēku saslimstību Latvijā (Ranka et al., 2004). Tomēr Latvijas suņiem konstatētā seropozitivitāte līdzinās tuvākajās valstīs novērotajai 3.9% Zviedrijā, 6.5% Čehijā, 1.09% Francijā (Egenvall et al., 2000a; Pejchalová et al., 2006; Pantchev et al., 2009). Interesanti, ka 36% (4/11) BB seropozitīvo suņu konstatējām

antivielas arī pret AP (3. attēls). Kopumā, secinām, ka BB seropozitivitāte suņiem Latvijā ir zema, tā nav augstāka suņiem ar SGA/boreliozes klīniskajām pazīmēm un seropozitīviem suņiem bieži novēro AP antivielu ko-ekspresiju.

Klīniski veselīgiem suņiem, ierosinātāju klātbūtni ar PQR nepārbaudījām. Koinfekcijas un antivielu koekspresija ir aprakstīta zinātniskajā literatūrā un tiek skaidrota ar to, ka patogēni nokļūšanai zīdītājos izmanto vienas sugas ērci (Gal et al., 2007; Beall et al., 2008; Pantchev et al., 2009).

Kopumā, secinām, ka no divām ĒPS, kuras ierosina baktērijas, un kurām ir līdzīgas klīniskās pazīmes, Latvijas suņiem biežāk satopama ir anaplazmoze.



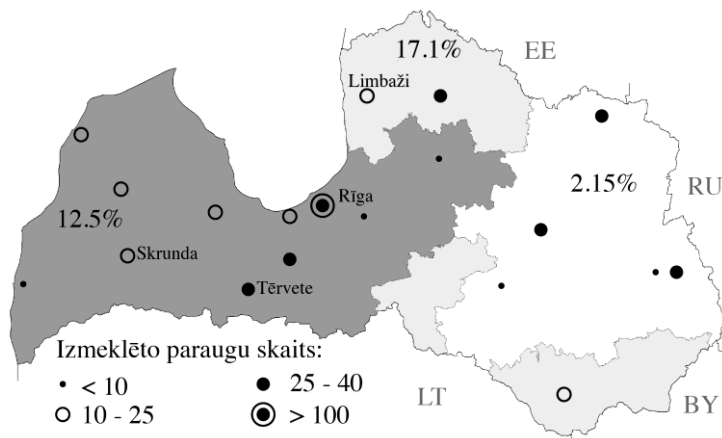
3 att. *B. burgdorferi* s. l. seropozitīvu suņu izplatība un antivielu ko-ekspresija pret *A. phagocytophilum*.

Kartē *I. ricinus* areāls – tumši pelēks (IR), *I. persulcatus* areāls – balts (IP), abu sugu ērces sastopamas gaiši pelēki atzīmētajos reģionos (M).

***A. phagocytophilum* un *B. burgdorferi* s.l. seropozitivitāti ietekmējošie faktori**

***I. ricinus* un *I. persulcatus* ērcu izplatība (I,III publikācija)**

Latvijā sastopamas divu sugu ērces ar izteiktiem un noturīgiem izplatības areāliem (Bormane et al., 2004; Bormane 2007; Karelis et al., 2012). Šo faktu izmantojām, lai noskaidrotu vai ĒPS seroprevalence suņiem ir saistīta ar IR un IP ērcu sugu izplatību, kas atpoguļota 4. attēlā. Konstatējām, ka IP areālā 12.5% (34/272) klīniski veselu suņu bija AP seropozitīvi, bet IP areālā seropozitivitāte bija būtiski zemāka – 2.2% (2/93) ($p=0.003$). M reģionos antivielas pret AP tika konstatētas 17.1% (13/76) klīniski veselo suņu, kas būtiski atšķīrās no AP seroprevalences IP reģionā ($p=0.0005$), bet neatšķīrās no IR reģionā konstatētās ($p>0.05$).



4.att. *A. phagocytophilum* seropozitivitāte klīniski veselām istabas un medību suņiem.

I. ricinus areāls (tumši pelēks), *I. persulcatus* areāls (balts), areāls, kur sastopamas abu sugu ērces (gaiši pelēks).

Vietas ar visaugstāko AP seropozitivitāti bija Tērvete (39.4%, 13/33), Skrunda (18.8%, 3/16) un Limbaži (18.5%, 5/27) (4. att). Pētot pieejamo zinātnisko literatūru par suņu AP seroprevalenci saistībā ar ērcu sugu izplatību konkrētā valstī, konstatējām, ka mūsu iegūtie dati ir unikāli, jo līdzīgus pētījumus neatradām. Informācija par augstas seroprevalences vietām var noderēt arī humānajiem ārstiem, jo tiek uzskatīts, ka suņi kalpo par humānās granulocitārās anaplazmozes sastopamības indikatoriem (Carrade et al., 2009).

Līdzīgu salīdzinājumu veicām arī attiecībā uz BB seropozitīvo suņu ģeogrāfisko izplatību saistībā ar IR un IP izplatības areāliem. Lai arī BB seropozitīvo suņu skaits bija zems, tomēr novērojām līdzīgu tendenci kā AP gadījumā – vairāk seropozitīvo suņu ir reģionos, kur sastopamas *I. ricinus* ērces (3. attēls).

Dzīvesvietas tips, ērcu piesūkšanās, akaricīdu lietošana (II publikācija)

Salīdzinot mūsu pētījumā iegūtos seroloģiskās izmeklēšanas rezultātus ar datiem, kas iegūti anketējot suņu saimniekus, noskaidrojām iespējamus riska faktorus, kas saistīti ar augstāku AP vai BB seropozitivitāti. Konstatējām, ka AP seropozitivitāte bija būtiski augstāka:

- laukos dzīvojošiem suņiem ($p < 0.05$);
- suņiem, kuriem ērces piesūkušās rudenī ($p < 0.05$).

Savukārt, izmeklētie faktori:

- suņu skaits māsaimniecībā;
- akaricīdu lietošana;

- piesūkušos ērcu skaits (< 10 vai >10 vienlaicīgi piesūkušos ērcu) nebija saistīti ar būtiski augstāku seropozitivitāti pret AP.

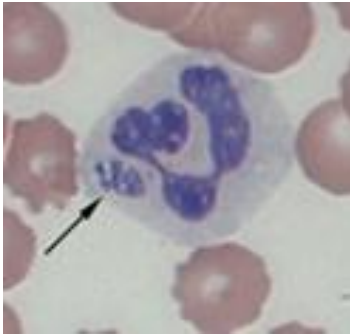
Augstāka AP seroprevalence laukos dzīvojošiem suņiem salīdzinājumā ar pilsētas suņiem tiek skaidrota ar lauku suņu biežāku saskarsmi ar ērcēm (Rand et al. 1991; Krupka et al. 2007; Carrade et al. 2009, Wu et al. 2009). Šis fakts ir pretrunā ar mūsu iepriekš konstatēto būtiskas atšķirības trūkumu starp klīniski veselām istabām un medību suņiem. Šo nesakrītību var skaidrot ar iespējamību, ka rezultātus ietekmē salīdzinoši nelielais mūsu pētījumā izmeklēto medību suņu skaits. Seropozitivitātes saistību ar ērcu piesūkušanos rudenī var saistīt ar faktu, ka rudenos aktīvākas ir pieaugušās ērces kamēr pavasaros aktīvākas ir nimfas (Carrade et al., 2009). Akaricīdu pielietošanas saistība ar seropozitivitāti ir neviennozīmīga: literatūrā ir aprakstīta gan aizsargājoša ietekme (Blagburn et al. 2005), gan tās trūkums (Wu et al. 2009; Kohn et al. 2011; Rand et al. 2011). Jāņem vērā, ka rezultāti iegūti anketējot dzīvnieku īpašniekus, kuri ne vienmēr ir informēti par pielietoto preparātu darbības mehānismiem, piemēram, vai konkrētais preparāts darbojas pret ērcēm vai tikai pret blusām u.c. (Hamer et al., 2009). Analizējot šo faktoru jāņem vērā ka nepārtraukti tiek veikti pētījumi un notiek jaunu produktu ieviešana tirgū kas ietekmē šī faktora saistību ar seropozitivitāti.

Salīdzinoši nelielā BB seropozitīvo suņu skaita dēļ nevaram spriest vai seropozitivitāti būtiski ietekmēja kāds no augstākminētajiem pētītajiem apkārējās vides faktoriem.

ĒPS klīniskie gadījumi suņiem Latvijā

Suņu granulocitārā anaplazmoze (I publikācija)

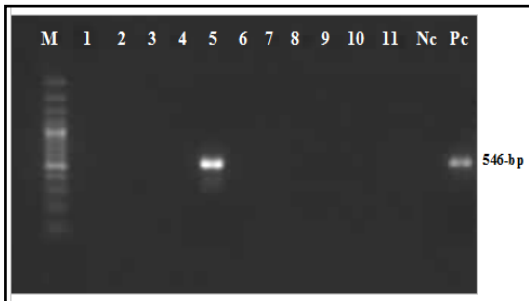
Pētījuma gaitā diagnosticējām pirmo SGA klīnisko gadījumu Latvijā. Suns bija astoņus gadus veca, bezšķirnes kuce, Foksa. Uz veterināro klīniku tā tika atvesta ar sekojošām klīniskām pazīmēm: drudzis (rektālā temperatūra 41°C), letarģija, anoreksija. Veicot laboratorisku asiņu izmeklēšanu tika konstatēta vidēji smaga leukocitoze 23.2 (6-17x10⁹/L) un smaga trombocitopēnija 40 (200-500 x 10⁹/L), kopējais eritrocītu skaits bija normāls 6.26 (5.5-8.5 x 10¹²/L). Hematoloģijas analizatora dati tika apstiprināti mikroskopiski izmeklējot asins uztriepi. Mikroskopējot perifērās asinis pieci procenti neitrofilo leukocītu citoplazmā saturēja zilganas apaļas baktēriju kolonijas jeb morulas (5. att.). Seroloģiski tika konstatētas antivielas pret AP un *Ehrlichia canis*.



5. att. *A. phagocytophilum* morula neitrofilā leikocīta citoplazmā.

Eritrocīti un neitrofilais leikocīts ar zilganu, nedaudz graudainu citoplazmas ieslēgumu *A. phagocytophilum* morulu (bulta).

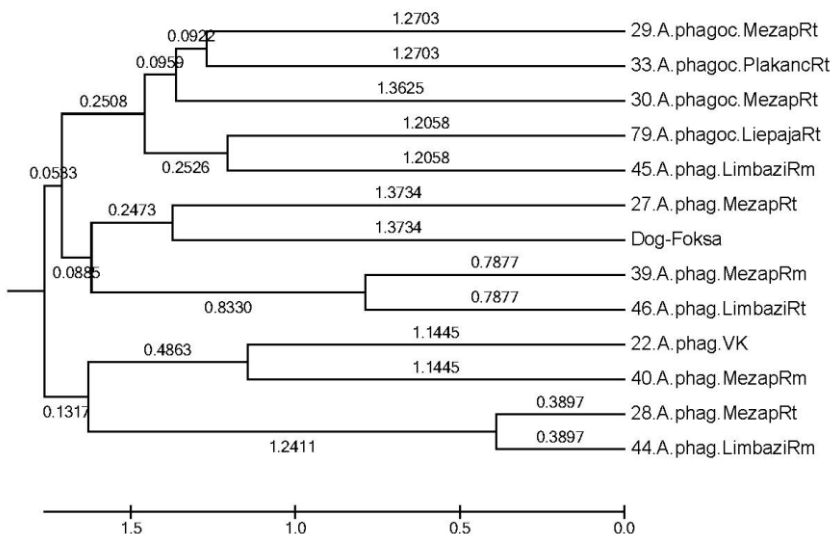
Veicot nPQR tika amplificēts 546 bāzu pārus garš AP 16S r RNS gēna segments un tādējādi apstiprināta tikai pirmā no abām infekcijām, *E. canis* DNS netika amplificēta (6. att.). Kā aprakstīts literatūrā, uzskatām, ka arī mūsu aprakstītajā gadījumā *E. canis* seropozitivitāte bija saistīta ar krosreakciju starp AP antivielām suņa asinīs un *E. canis* antigēnu testā (Bormane, 2007; Carrade et al., 2009; Carrade et al., 2011; Pantchev et al., 2009)



6. att. Agarozes gels ar amplificēto *A. phagocytophilum* 16 S rRNS gēna produktu.

M – molekulārais marķieris, slejas 1-11 – suņu asins paraugi (5.līnija – pozitīvs paraugs), Nc – negatīvā konrole, Pc- pozitīvā konrole.

No klīniski slima suņa izdalītās DNS sekvenču rezultāti sakrīta ar Ģēnubankā pieejamo AP 16S rRNS gēna sekvenču prototipu, kas izolēts no cilvēka (U02521). Arī AP izolāts, kas bija izdalīts no Mežaparkā iegūta *I. ricinus* tēviņa bija ģenētiski identisks AP izolātam, kas iegūts no klīniski slimā suņa mūsu pētījumā. Izolātu ģenētiskā līdzība attēlota 7. Attēlā, AP izolāti no ērcēm Latvijā iegūti no A. Bormanis pētījumiem (Bormane, 2007), suns Foksa (dog-Foksa) ir izolāts no klīniski slimā suņa Foksa (7.att.).



7. att. No klīniski ar SGA slima suņa (Dog-Foksa) izolētās AP sekvenču filoģenētiskā saistība ar AP sekvenčām, kas izdalītas no Latvijā izmeklētām ērcēm. Rm – *I. ricinus* mātiņe; Rt- *I. ricinus* tēviņš.

Suns tika ārstēts ar doksiciklīnu un trešajā dienā novēroja klīnisko pazīmju uzlabošanu. Izdalītā sekvenču ievietota Ģēnu bankā ar numuru JQ966109 (izraksts no GenBank datubāzes 3. pielikumā)

Suņu babezioze (IV publikācija)

Latvijas veterinārārsti mūsu pētījuma vajadzībām iesūtīja informāciju un asins paraugus no trīs klīniski slimiem suņiem, kuriem laboratorijās vai veterinārajās klīnikās, mikroskopiski izmeklējot asinis, eritrocītos tika konstatētas lielās babēzijas.

Mūsu pētījuma ietvaros, veicām iesūtīto asins paraugu hematoloģisku, seroloģisku un molekulāru izmeklēšanu, kā arī atsūtītās informācijas (klīniskās pazīmes, laboratoriskās izmaiņas, ārstēšana, iznākums) analizēšanu un salīdzināšanu ar zinātniskajā literatūrā pieejamo informāciju.

Visiem trīs suņiem eritrocītos konstatējām lielās babēzijas un veicot 18S rRNS gēna amplifikāciju un izolāta sekvenēšanu apstiprinājām, ka etioloģiskais aģents visos trīs gadījumos ir *B.canis canis*. Visiem trīs suņiem konstatētas klīniskās pazīmes, kas detalizēti atainotas 4.tabulā, sakrīt ar iepriekš literatūrā aprakstītajām BC izraisītas babeziozes klīniskajām pazīmēm (Ayoob et al., 2010). Vienam no suņiem (suns 1) babezioze tika diagnosticēta novēloti (11 dienas pēc pirmās vizītes), līdz ar to klīniskā aina diagnozes noteikšanas brīdī bija smagāka, kam iespējams bija ietekme letālajā iznākumā.

Kopumā, secinām, ka suņiem Latvijā babezioze izpaužas kā vidēji smaga līdz smaga slimība, un kā aprakstīts literatūrā ir iespējami gan letāli gadījumi (suns 1), gan izveseļošanās pielietojot tikai simptomātisku ārstēšanu (suns 3). Šāda slimības iznākumu dažādība pastiprina konkrētas diagnozes noteikšanas nozīmību, jo uzsākot savlaicīgu ārstēšanu iespējas izvairīties no slimības komplikācijām ir lielākas (Ayoob et al., 2010).

4. tabula

Anamnēze, klīniskā aina, ārstēšana un iznākums trīs Latvijas suņiem ar babeziozi

	Suns 1	Suns 2	Suns 3
Suga, vecums, dzimums	Darthārs, 7, Vīr	Zelta retrivers, 4, siev	bezšķirnes, 3, vīr
Dzīvesvieta/ ērcu suga	Liepāja/ IR	Rīga / IR	Rīga/IR
Klīniskās pazīmes			
Drudzis	jā	jā	jā
Letarģija	jā	jā	-
Anoreksija	jā	-	jā
Laboratorijas testi			
Anēmija	vidēja	viegla	smaga
Trombocitopēnija	smaga	smaga	smaga
Hemolīze	jā	jā	jā
AST, ALT	viegla ↑	viegla ↑	vidēja ↑
Papildus informācija			
Ārstēšana	asins pārliešana, simptomātiska	imidokarba dipropionāts, simptomātiska	simptomātiska
Komplikācijas	iespējama hemoglobīna nefrotoksicitāte	nav	nav
Iznākums	nomira	izveseļojās	izveseļojās

↓↑- rādītājs pazemināts vai paaugstināts; - pazīme nav novērota, tests nav veikts; AST – aspartāta aminotransferāze, ALT – alanīna aminotransferāze*

No Latvijas suņiem izolētie BC celmi 98-100% atbilst citviet Eiropā no suņiem izolētajiem BC celmiem (Solano – Gallego un Baneth, 2011, Øines et al., 2010). Vienā no izdalītajām BC sekvencēm (suns 3) 150-tajā pozīcijā konstatējam AG→GA inversiju, salīdzinot ar pārējām divām sekvencēm no Latvijas suņiem. Šāda nukleotīdu maiņa ir aprakstīta arī BC izolātam Polijā. Pašlaik nav skaidrs, vai šīs izmaiņas ietekmē arī BC patogenitāti (Adaszek et al., 2011).

Gēnu bankā no trim Latvijas suņiem izolētās BC sekvenču ievietotas ar sekojošiem numuriem JX227980 (1.suns) JX227981 (3.suns). 2.suņa sekvence bija

vienāda ar 1.suņa sekvenci, bet īsāka, tādēļ tā netika nosūtīta Gēnu bankai. Izraksti no GenBank datubāzes pievienoti 3. pielikumā.

Tā kā Latvijas ērcēs BC līdz šim nav konstatētas, nav iespējams pateikt tieši kādā veidā suņi inficējušies. Literatūrā minēti vairāki iespējamie inficēšanās veidi teritorijās, kuras līdz šim tika uzskatītas par babeziozes brīvām:

- inficētas ērces imports (piemēram ar pārlidojošiem putniem)
- BC pārnēsājošo *Dermacentor reticulatus* ērcu izplatības areāla paplašināšanās
- BC adaptācija pārnesei ar IR vai IP ērcēm (Rar et al., 2005; Cieniuch et al., 2009; Menn et al., 2010; Øines et al., 2010; Lempereur et al., 2011).

Kopumā uzskatam, ka ĒPS suņiem Latvijā varētu tikt nepietiekami diagnosticētas, galvenokārt, nespecifisko klīnisko pazīmju dēļ, vai arī laboratorisku kļūdu dēļ. Balstoties uz šo trīs gadījumu analīzi, iesakam praktizējošiem veterinārārstiem babeziozes aizdomu gadījumos, veikt biežu un atkārtotu asins uztriepju mikroskopiju, kā arī izmeklēt perifērās asinis (piemēram no auss skrimstalas), kas uzlabo diagnostikas metodes jutību (Ayoob, et al., 2010).

A. *phagocytophilum* saistība ar ādas bojājumiem seropozitīviem suņiem (V publikācija)

Latvijā suņiem visaugstāko seroprevalence konstatējām pret AP. Ziemeļeiropā konstatētā seroprevalence ir līdzīga mūsu konstatētajai (Egenvall et al., 2000b), turklāt šajā reģionā aktīvi tiek pētīta AP persistence organismā (Egenvall et al., 2000a; Granquist et al., 2010), tādēļ arī mēs izlēmām pievērsties šai jomai.

Ar PĶR metodes palīdzību AP DNS izolējām astoņās no 65 biopsijām, visi suņi ar pozitīvu ādas PĶR bija arī seropozitīvi. PĶR tika veikta izmantojot formalīnā fiksētu, parafīnā ieguldītu materiālu. PĶR pozitīvo suņu ampliconu sekvence (n=3) sakrita ar gēnu bankā atrodamo, no cilvēka izdalīto AP gēna sekvenci (U02521). Izdalītās sekvences tika ievietotas GenBank datubāzē ar sekojošiem numuriem KC119573, KC119574 un KC119575, izraksti no GenBank datubāzes pievienoti 3. pielikumā.

Seroloģijas titri visiem PĶR pozitīvajiem suņiem bija augstāki par 1:40 (literatūrā aprakstītais zemākais antivielu titrs, kas tiek uzskatīts par pozitīvu; Ebani et al., 2008) - 1:320, 1:800, 1: 200 un 1:2048. Šie titri ir samērā augsti un līdzīgi literatūrā aprakstītajiem titriem, kas konstatēti suņiem ar SGA un ādas problēmām (1:128 līdz 1:1024) (Ravnik et al., 2011).

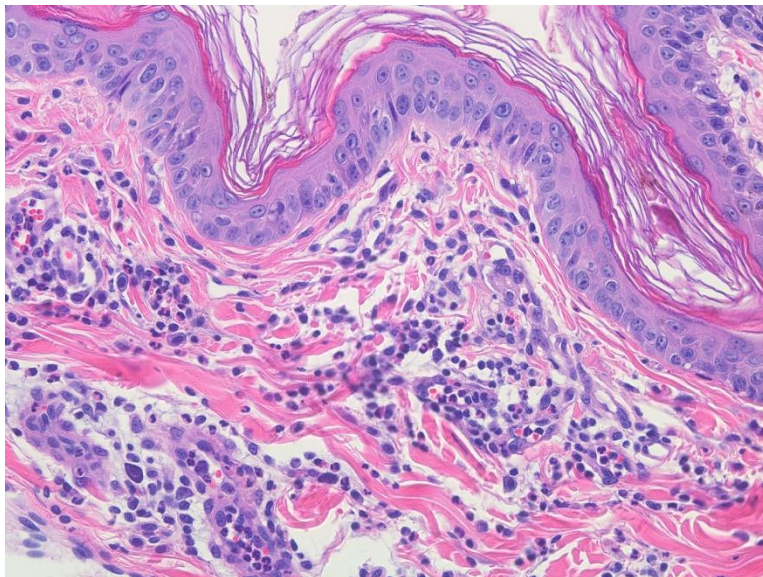
PĶR pozitīvo suņu ādas paraugos konstatētās makroskopiskās pārmaiņas bija dažādas (5. Tabula).

PQR pozitīvo suņu ādas bojājumi

Nr.	Ādas bojājumu veids	Morfoloģiskā diagnoze
1	Eritēmas, pustulas, mezgliņi	Vaskulopātija, multifokāli nekrotiski perēkļi dermā un epidermā. Dermatīts, neitrofilis, limfocītisks, plazmas šūnu, virspusējs, perivaskulārs līdz intersticiāls, viegls.
2	Zemādas tūska	Matu folikulu cikla arrests ar folikulāru atropiju, dermas tūska, vidēja
3	Eritēmas, zvīņas	Vaskulopātija ar dziļu dermas tūsku un fokālām hemorāģijām. Dermatīts, neitrofilis, plazmas šūnu, tuklo šūnu fokāli eozinofīlie leikocīti, perivaskulārs līdz intersticiāls, vidējs.
4	Eritēmas, makulas	Dermatīts, neitrofilis, eozinofils, limfocītisks, perivaskulārs līdz intersticiāls, vidējs ar smagu leukocitostāzi.

Nelielā PQR pozitīvo paraugu skaita un makroskopisko pārmaiņu dažādības dēļ nevaram secināt vai pozitīvajiem paraugiem ir tendence būt lokalizētiem kādā konkrētā vietā vai arī tos raksturo kādas konkrētas makroskopiskas izmaiņas.

PQR pozitīvo suņu ādas paraugos konstatētās mikroskopiskās pārmaiņas bija dažādas un nespecifiskas. Histoloģiskajos ādas griezumos konstatējām epidermas hiperplāziju, vieglu līdz smagu tūsku un subepidermālas hemorāģijas. Multifokālus iekaisuma šūnu infiltrātus konstatējām, gan virsējā dermā, gan ap matu sviedru un tauku dziedzeriem tie sastāvēja no neitrofilajiem leikocītiem, histiocītiem, limfocītiem, plazmas šūnām, makrofāgiem un eozinofīlajiem leikocītiem (8.att.).



8. att. *A. phagocytophilum* seropozitīva un PĶR pozitīva suņa ādas biopsijas histoloģiskais griezumš.

Dermā redzams vidēji smags perivaskulārs iekaisuma šūnu infiltrāts ar plazmas šūnām, limfocītiem, nelielu skaitu eozinofilo leukocītu, tuklo šūnu un retiem neutrofilajiem leukocītiem. Dermā vidēji izteikta tūska. Asinsvadu endotēlijs ir aktivizēts un tajos ir daudz neutrofilo leukocītu. H&E, 200x.

Ar IHĶ metodes palīdzību, pielietojot, gan monoklonālās, gan poliklonālās antivielas, mēģinājām atrast AP antigēnu PĶR pozitīvajos ādas audos, tomēr tas bija nesekmīgi – visi krāsojumi bija negatīvi. Negatīvs IHĶ rezultāts ar pozitīvu PĶR (perifērajās asinīs) tika konstatēts arī humānās granulocitārās anaplazmozes pacientei ar Sweets sindromu jeb akūto febrilo neutrofilo dermatozu (Halaz et al., 2005). Savukārt jēriem akūtas AP infekcijas gadījumā aprakstītas pozitīvas ādas biopsiju PĶR un IHĶ. Negatīvo IHĶ rezultātu mūsu pētījumā var skaidrot ar mazāka apjoma ādas materiāla izmeklēšanu ar IHĶ metodi, salīdzinot ar PĶR kā arī ar nelielu skaitu morulu paraugā.

Uzskatām, ka AP izolēšana no suņu ādas biopsijām ir unikāls fakts un liecina par AP iespējamu persistenci seropozitīvu suņu ādā un spēju izraisīt ādas problēmas. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem secinām, ka AP var tikt izolēta no seropozitīvu suņu ādas biopsiju paraugiem un šis ierosinātais varētu būt saistīts ar ādas problēmām, kā arī persistēt ādā.

NOBEIGUMS

Pateicoties mūsu pētījumiem ir noskaidrojies, ka pašreiz suņiem Latvijā ir aktuālas sekojošas ērcu pārnēsātas slimības – suņu granulocitārā anaplazmoze, borelioze un babezioze. Latvijā konstatētā seroprevalence pret *A. phagocytophilum* un *B. burgdorferi* s.l. līdzinās citās Ziemeļeiropas/Austrumeiropas valstīs konstatētajai. Šajā pētījumā konstatētā seroprevalences saistība ar dažādiem apkārtējās vides faktoriem (ērcu sugu konkrētajā reģionā, suņa dzīvesvietu, gadalaiku u.c.) palīdzēs veterinārārstiem, analizējot ievāktos anamnēzes datus, izslēgt vai iekļaut ĒPS diferenciāldiagnožu sarakstā. Pateicoties šim pētījumam daudzi veterinārārsti un suņu īpašnieki Latvijā tika informēti par ĒPS, to izplatību, ārstēšanu u.c. aktuāliem jautājumiem. Tomēr, mēs apzinamies, ka šāds pētniecības darbs nekad nav pabeigts un pētījumu gaitā ir radušies daudzi jautājumi, kurus plānojam pētīt nākotnē. Pašlaik tiek veikta molekulārbioloģiska no suņiem ievāktu ērcu analīze, lai noskaidrotu, kādus slimību ierosinātājus tās satur. Nākotnē plānojam turpināt arī slimību patoģenēzes pētījumus.

SECINĀJUMI

1. Latvijā dzīvojošiem klīniski veselīgiem suņiem visbiežāk konstatētais ērcu pārnēsātu slimību ierosinātājs bija *A. phagocytophilum* (seroprevalence 11.1%). Suņiem ar *A. phagocytophilum* infekcijai raksturīgām klīniskajām pazīmēm konstatētā seroprevalence bija augstāka (17.2%), bet tā būtiski neatšķīrās no seroprevalences veselīgiem suņiem. Latvijas suņiem daudz retāk konstatētas antivielas pret *B. burgdorferi* s.l. (seroprevalence 2.5%). *B. burgdorferi* s.l. netika atrastas nevienam sunim ar boreliozes klīniskajām pazīmēm. *E. canis* antivielas Latvijas suņiem netika konstatētas.
2. Reģionos, kur ir izplatītas *I. ricinus* ērces (Rietumu un Centrālā Latvija), suņiem konstatēta būtiski augstāka ($p=0.003$) *A. phagocytophilum* seropozitivitāte salīdzinot ar *I. persulcatus* izplatības reģioniem (Austrumlatvija). Nelielā *B. burgdorferi* s.l. seropozitīvo gadījumu skaita dēļ nevaram spriest par šī ierosinātāja saistību ar ērcu sugu izplatību Latvijā.
3. Būtiski augstāka *A. phagocytophilum* seropozitivitāte konstatēta laukos dzīvojošiem suņiem un gadījumos, ja ērce sunim piesūkusies rudenī. Mūsu pētījumā suņu skaits mājvietā, piesūkušos ērcu skaits, medības un akariādu lietošana nebija saistīti ar augstāku *A. phagocytophilum* seropozitivitāti suņiem Latvijā. *B. burgdorferi* s.l. seropozitīvo suņu nelielā skaita dēļ nevaram spriest vai paaugstināta seropozitivitāte pret šo baktēriju ir saistīta ar kādu no pētītajiem faktoriem.
4. Latvijas suņiem diagnosticēta un aprakstīta klīniska saslimšana ar suņu granulocitāro anaplazmozi (ierosinātājs *A. phagocytophilum*) un babeziozi, (ierosinātājs *B. canis canis*). No Latvijas suņa izolētā *A. phagocytophilum* bija

100% homologa *A. phagocytophilum* sekvennei, kas izolēta no ērces Mežaparkā, kā arī Ģēnu bankā ievietotajai no cilvēkiem izolētajai sekvennei. Latvijas suņiem konstatētajos babeziozes gadījumos apstiprināta autohtona slimības izcelsme, kas norāda uz vektora klātbūtni Latvijā vai ierosinātāja *B. canis canis* pielāgošanos Latvijā sastopamam vektoram (*Ixodes* ērcu sugām). No Latvijas suņiem izolētie ierosinātāji bija 98-100% homologi Ģēnu bankā ievietotajām *B. canis canis* sekvencēm no dažādām Eiropas valstīm.

5. *A. phagocytophilum* DNS var tikt izolēta no seropozitīvu suņu bojātas ādas biopsijām, šis fakts atbilst hipotēzei par ādu kā vienu no *A. phagocytophilum* persistences vietām.

IETEIKUMI PRAKSEI

1. Suņiem ar drudzi, letarģiju, trombocitopēniju diferenciāldiagnožu sarakstā iekļaut ērcu pārnēsātas slimības – granulocitāro anaplazmozi un boreliozi.
2. Suņiem ar imūnmediētu hemolītisko anēmiju, trombocitopēniju, anēmiju, letarģiju izslēgt babeziozi.
3. Pret *A. phagocytophilum* seropozitīviem suņiem ar dermatoloģiskām problēmām diferenciāldiagnožu sarakstā iekļaut persistentu granulocitāro anaplazmozi.
4. ĒPS diagnožu noteikšanai izmantot kompleksu pieeju, ņemot vērā klīniskās pazīmes, anamnēzes datus un veicot vairākus laboratoriskos testus (tajā skaitā asiņu mikroskopisku izmeklēšanu).
5. Ievācot anamnēzes datus iegūt informāciju par ērcu piesūkšanos sunim, par pret ērcu preparātu lietošanu sunim un par vidi, kurā suns dzīvo.
6. Gan veterinārārstiem, gan humānajiem ārstiem iesakām ņemt vērā faktu par *A. phagocytophilum* augstāku sastopamību *I. ricinus* izplatības reģionos un atsevišķās augstākas seroprevalences zonās (Tērvete, Limbaži, Skrunda).

ABBREVIATIONS

AP	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
BB	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato genogroup
BC	<i>Babesia canis canis</i>
PCR	polymerase chain reaction
EDTA	ethylendiaminetetraacetic acid
TBD	tick-borne disease
IgG, IgM	immunoglobuline G, immunoglobuline M
IHC	immunehistochemistry
IMHA	immunemediated hemolytic anemia
IP	<i>Ixodes persulcatus</i> tick habitat
IR	<i>Ixodes ricinus</i> tick habitat
OR	odds ratio
CI	confidence interval 95%
M	areas inhabited by both <i>I. ricinus</i> and <i>I. persulcatus</i> ticks
nPCR	nested polymerase chain reaction
cPCR	conventional polymerase chain reaction
CGA	canine granulocytic anaplasmosis
PSGL-1	P selectin glykoproteine ligand 1
RNA	ribonucleic acid
OP	oral presentation
PP	poster presentation

ORIGINAL PUBLICATIONS

PhD theses are composed of five original, scientific, peer reviewed publications that have been published or are accepted for publication. In this summary they will be denoted by Roman numerals from I to V.

- I. **I. Berzina**, V. Capligina, A. Bormane, A. Pavulina, V. Baumanis, R. Ranka, R. Granta, I. Matise. (2013) Association between *Anaplasma phagocytophilum* seroprevalence in dogs and distribution of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks in Latvia. Ticks and Tick-borne diseases, 4:83-88.
- II. **I. Berzina**, I. Matise. (2013) Association between the use of the acaricides, household type, tick bite and seropositivity against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinically healthy dogs in Latvia. Environmental and Experimental Biology, 11:47-51.
- III. **I. Berzina**, I. Matise. (2013) Seroprevalence against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and occurrence of antibody co-expression with other tick-borne diseases in dogs in Latvia. Irish Veterinary Journal, DOI: 10.1186/2046-0481-66-9
- IV. **I. Berzina**, V. Capligina, D. Cirule, I. Matise. (2013) Autochthonous canine babesiosis caused by *Babesia canis canis* in Latvia. Veterinary Parasitology, DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.03.015
- V. **I. Berzina**, C. Krudewig, C. Silaghi, I. Matise, R. Ranka, N. Müller, M. Welle. *Anaplasma phagocytophilum* DNA amplified from lesional skin of seropositive dogs. Ticks and Tick-borne diseases. (Revised version with the specific answers to the reviewers comments was submitted to the editor of the „Ticks and Tick-borne diseases” on 10th July 2013).

INTRODUCTION

Several tick-borne diseases (TBD) are commonly diagnosed in humans in Latvia (Bormane, 2007). However, up to now, in Latvia these diseases have not been studied in animals. A literature review revealed similar distribution of several TBD between humans and dogs, therefore we opted to study TBD in this particular animal species.

This summary contains information on three TBD that we analyzed in dogs in Latvia – canine granulocytic anaplasmosis (CGA), borreliosis and babesiosis.

These PhD theses are based on five original publications. In this summary the papers and manuscripts will be denoted with Roman numerals I-V. Original publications have been used with permission of co-authors and publishers.

Relevance and aim of the study

Bovine babesiosis was the first TBD in animals that was described in Latvian press (Pakuls, 1927). Up to now TBD have not been studied in animals in Latvia, but they have been diagnosed and treated by practitioners (Buivide – Zvīdriņa, 2009). Latvian dogs are frequently infested by ticks; however, without knowledge on the specific TBD in Latvia it is difficult for veterinarians to choose the right diagnostic methods and provide their patients with an evidence based treatment. Taking into account that clinical signs of several TBD are nonspecific, it is essential to have locally acquired information (Carrade et al., 2009).

On the other hand several researcher groups are actively working on the research of human tick-borne encephalitis and borreliosis that both are endemic in humans in Latvia. During the last decade increasing numbers of granulocytic anaplasmosis cases have been diagnosed in humans in Latvia (Bormane et al., 2004; Ranka et al., 2004; Bormane, 2007; Süß, 2011).

Vector borne infectious diseases are actively researched all over the world (Parola un Raoult, 2001; Beal et al., 2008; Nicholson et al., 2010; Chomel, 2011; Bowman et al., 2012). Information on the seroprevalence in dogs in a particular area can be used to assess the risk of TBD in human population in the same area (Beal et al., 2008; Carrade et al., 2009, Day, 2011).

At the beginning of our work we hypothesized that:

- dogs in Latvia suffer from several TBD- granulocytic anaplasmosis, borreliosis;
- tick borne diseases are more common in dogs with clinical signs associated with these diseases;
- tick borne diseases are more common in dogs that are in frequent contact with ticks (hunting dogs, dogs in rural areas);

- tick borne disease seroprevalence in dogs is not associated with tick species in Latvia;
- *Anaplasma phagocytophilum* has a potential to cause skin lesions in persistently infected dogs.

The aims of this study were: (1) to establish the seroprevalence of TBD and the associated epidemiological factors in Latvian dogs; (2) to describe the clinical TBD cases and isolated organisms; (3) to describe the pathological changes associated with TBD.

Objectives

1. To detect the following organisms: *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l., *Ehrlichia canis* and *Babesia* spp. in the peripheral blood of clinically healthy Latvian pet and hunting dogs and in dogs with clinical signs of tick-borne diseases.
2. To evaluate the association between the tick species *I. ricinus* and *I. persulcatus* habitat regions and *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. seropositivity in dogs in Latvia.
3. To evaluate the possible association between antibodies against *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* s.l. in clinically healthy dogs and the factors: use of acaricides, household type, and history of tick bites
4. To describe the clinical cases of tick-borne diseases in dogs in Latvia and by the molecular methods to define to species level the the isolated causative organisms.
5. To assess the presence of *A. phagocytophilum* within the lesional skin biopsies from seropositive dogs by employing the polymerase chain reaction and immunohistochemistry methods.

Novelty of the study

1. This was the first study on canine granulocytic anaplasmosis, borreliosis and babesiosis in dogs in Latvia.
2. We have described the first autochthonous canine granulocytic anaplasmosis and babesiosis cases in dogs in Latvia and have deposited the sequences of the isolated agents in the GenBank.
3. We have reported a higher *A. phagocytophilum* seroprevalence in dogs that resided in *I. ricinus* tick habitat.
4. Dogs in rural areas and tick bite in autumn were at higher risk to be seropositive for *A. phagocytophilum*.
5. For the first time we isolated *A. phagocytophilum* DNA from the lesional skin biopsies from seropositive dogs.

Approbation of the results at the international scientific conferences

1. I. Berzina, I. Petersone, I.Matise. Tick-borne diseases: case analysis. Research for rural development, 19-21.May 2010. Jelgava, LLU, Latvija. (OP – oral presentation)
2. I. Berzina, I. Matise. Sākotnējie dati par ērcu pārnēsātu slimību sastopamību suņiem Latvijā. LLU VMF zinātniskā konference 29.October. 2010., Jelgava, Latvija. (OP)
3. I. Berzina, A. Bormane, I. Matise. Association between *A. phagocytophilum* in ticks and anaplasmosis in dogs in Latvia. International Meeting on Emerging Diseases (IMED), 4-7.February, 2011.Viena, Austria. (PP – poster presentation)
4. I. Berzina, I.Matise. Tick-borne diseases in dogs in Latvia. International Jena Symposium on Tick-borne diseases, 24-26.March, 2011. Weimar, Germany. (PP)
5. I. Berzina, N. Müller, C. Krudewig, C. Silaghi, I.Matise, R.Ranka, M. Welle. PCR based detection of *A. phagocytophilum* DNA in paraffin embeded skin biopsies from dogs seropositive against *A. phagaocytophilum*. European Society of Veterinary Clinical Pathology & International Society of Animal Clinical Pathology konference, 3-7.July, 2012. Ljubljana, Slovenia. (OP)
6. I. Berzina, I. Matise. Ērcu pārnēsātās slimības suņiem Latvijā: anaplazmoze, borelioze, babezioze. LLU VMF zinātniskā konference 22-23.November 2012. Jelgava, Latvija. (OP)
7. I. Berzina, C. Krudewig, I.Matise, M. Welle. Histopathological changes in the skin associated with persistent canine granulocytic anaplasmosis. American College of Veterinary Internal Medicine Forum, 12-15.July, 2013, Seattle, WA, USA, (OP).

LITERATURE REVIEW

Tick species and tick-borne pathogens in Latvia

In Latvia there are two epidemiologically important tick species - *I. ricinus* and *I. persulcatus* that belong to the Ixodidae family, genus Ixode (Bormane, 2007). The distribution of the tick habitat has been uniform since 1995 – *I. ricinus* reside in the Central and Western areas, while *I. persulcatus* mainly reside in Eastern part of Latvia. Between these two areas there are regions where both tick species have been found (Bormane, 2007, Karelis et al., 2012). Both tick species carry several human and animal TBD agents (Table 1.).

Table 1

Pathogens in Latvian ticks (% infested/ analyzed) (Bormane, 2007)

Tick species	AP*	BB	<i>Babesia spp</i> *
<i>I. ricinus</i>	~10% (28/289)	32.3% (40/124)	~ 10.1% (22/219) <i>B. microti, B. bovis</i>
<i>I. persulcatus</i>	0	34.6% (53/153)	~ 8.9% (7/78) <i>B. microti, B. divergens</i>

*pooled samples analyzed (10 imago ticks in one pooled sample)

Tick-borne diseases in humans in Latvia

In 1941 several newspapers informed people of Latvia SSR that dangerous neural disease has affected taiga hunters and about Soviet scientists struggle with discovering the cause of this devastating disease, but in 1957 newspaper “Cīņa” informed the readers that the human tick-borne encephalitis has been diagnosed in Latvia (Vītoliņa, 1957).

Former Soviet republics, after the regaining the independence have experienced common problems in the reformation of the social and economical structure. As it turned out, these socioeconomic factors (for example, unemployment level) played a significant role in the epidemiology of the TBD (Godfrey and Randolph, 2011). Significant increase in tick-borne encephalitis cases in the Baltic states has been noted during 1990-ties and in years of the last crisis (Sumilo et al., 2007; Kovalcuka et al., 2012).

Two TBD are endemic for humans in Latvia – tick-borne encephalitis (morbidity 6.2-22.3 per 100 000 inhabitants and borreliosis (morbidity 14-36.9 per 100 000 inhabitants).

In last decade 26 cases of human granulocytic anaplasmosis have been diagnosed in Latvia (data from years 2001. to 2010, personal communication A. Bormane).

Relationship among ticks, pathogens and host animal

Any existing TBD requires a unique relationship between the tick, pathogen and the host animal. By modulating the gene expression pathogens are able to change physiology and behaviour of the tick, thus achieving more active questing (Carrade et al., 2009). Engorged tick releases saliva that contains powerful immunomodulators and other substances that protect the pathogen from the immune system of the host animal and promotes its distribution within the host tissues (Carrade et al., 2009).

Tick bite is the main route of canine granulocytic anaplasmosis (CGA), borreliosis and babesiosis. Babesiosis and anaplasmosis have also been transmitted through blood sucking parasites other than ticks, such as via infected dog bite or transplacental (Carrade et al., 2009; Solano – Gallego and Baneth, 2011).

Multiple factors affect the ability of the pathogen to cause the disease within the host animal – length of the time that the tick has been attached to the host, activity and concentration of the pathogen, its localization within the tick and host' immune system (Kidd et al., 2003; Granquist et al., 2010). Several TBD risk factors have been published:

- season with higher nymphal or imago tick activity, spring or autumn, respectively;
- coinfection with several tick-borne pathogens;
- percentage of ticks carrying the pathogens in the particular neighborhood;
- working dogs (hunting, herding);
- length of the tick attachment to the host;
- age – mean age for CGA patient is 6-8 years (Carrade et al., 2009). In experimentally infected dogs the clinical signs of borreliosis are more prominent in puppies, while adult dogs seroconvert without showing any clinical signs (Straubinger 2011). Babesiosis is more frequently diagnosed in young or young adult dogs (1-4 years) (Solano-Gallego un Baneth, 2011);
- splenectomy – associated with more severe clinical signs of babesiosis (Hunfeld et al., 2008).

Incubation period, pathogen circulation in the blood and clinical signs of particular TBD are associated with the changes caused by pathogen itself (babesia disrupt the erythrocytes) and with secondary immunemediated response (CGA, borreliosis) (Table 2).

Table 2

***Anaplasma phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. and *B. canis canis* transmission time, incubation period and circulation in canine blood**

Pathogen	AP	BB.	BC
Tick attachment (hours)	24-48	24- 72	48-72
Incubation period (weeks)	1-2	8-20*	1-3
Blood circulation (days)	<28	0	30-1000^

(Carrade et al., 2009, Kohn et al., 2008; Straubinger 2000; Homer et al., 2000; Ayoob et al., 2010; Kirtz, et al., 2012)

* experimentally infected dogs, ^ depending on acitivity of humoral immunity.

Canine granulocytic anaplasmosis

Anaplasma phagocytophilum is an obligatory intracellular rickettsia. The disease granulocytic anaplasmosis has been diagnosed worldwide (Egenvall et al., 2000a; Melter et al., 2007; Carrade et al., 2009; Kybicova et al., 2009; Kohn et al., 2011), but in Europe it is the most widespread TBD in animals (Stuen, 2007). It affects multiple animal species – cattle, horses, dogs, sheep, while several wild animals, including small rodents, deer and possibly birds, that serve as reservoirs for *A. phagocytophilum* (Billeter et al., 2007; Stuen, 2007; Carrade et al., 2009).

Since 2001 when a complete genome of AP was sequenced the term AP comprises three previously separate species: *Ehrlichia equi*, *E. phagocytophila* and human granulocytic anaplasmosis agent (Dumler et al., 2001).

Ixodes ricinus ticks are the main AP vectors in Europe, while *I. persulcatus* is considered the main vector in Asian countries (Carrade et al., 2009; Paulauskas et al., 2009). In Latvia both of the above mentioned tick species have been detected (Bormane et al., 2004, Karelis et al., 2012), however, *A. phagocytophilum* have been found only in *I. ricinus* (Bormane, 2007). Therefore we chose to investigate if there is any difference between the seroprevalence in dogs residing in different tick habitat areas. Dogs are considered to be accidental hosts with short rickettsiemic phase, thus they are not important as reservoir animals (2. table).

Pathogenesis and clinical signs

Pathogenesis is not fully understood (Carrade et al., 2009) but in vitro studies have found that AP uses membrane proteins such as PSGL-1 and others to enter the host cells via caveolae mediated endocytosis that prevents them from being phagocytosed (Lin and Rikihisa, 2003). By employing the AnkA gene AP actively modifies the environment of the host cell and specifically it is able to inhibit the production of superoxide that results in impaired fagocytic ability of the cell, lower motility that hampers the movement to the tissue (Rikishisa, 2011).

AP most frequently infects neutrophil leukocytes, but within the bone marrow CD34 positive cells (endothelial cells, megacaryocyte lineage cells) also have been

found to be infected, these cells might be associated with the persistence of the CGA as well as cell to cell infection (Carrade et al., 2009). Rickettsial organisms multiply forming colonies or morulae within the cytoplasm of the infected cell (Kohn et al., 2008).

Acute CGA mostly goes undetected or is associated with unspecific clinical signs: fever, lethargy, anorexia, painful joints (Melter et al., 2007; Carrade et al., 2009; Granick et al., 2009). In naturally infected dogs the most commonly noted laboratory abnormalities are thrombocytopenia, anemia and increased liver enzymes (Carrade et al., 2009). In studies with experimentally infected lambs was discovered that some of the AP strains are associated with more severe clinical disease than others, such data are not available for dogs (Stuen et al., 2003; Poitout et al., 2005; Morissette et al., 2009; Canelas Domingos et al., 2011; Kohn et al., 2011).

In dogs, sheep, horses and cattle persistent granulocytic anaplasmosis has been diagnosed (Pusterla et al., 1997; Egenvall et al., 2000b; Stuen et al., 2008; Franzen et al., 2009; Granquist et al., 2010). This infection has been diagnosed based on high antibody titer, positive PCR and recurrent ricketsemia after the resolution of the clinical signs associated with the acute phase of the disease (Egenvall et al., 2000b; Stuen et al., 2008). Persistent disease is not characterized with clinical signs. Persistence of the AP has been studied in several experimental studies and skin has been suggested as one of the potential sites of the persistence (Granquist et al., 2010). AP infection in the skin has been characterized by epidermal hyperplasia and inflammatory cell infiltrate within the dermis (Granquist et al., 2010). Therefore we opted to investigate if skin lesions in seropositive dogs could be associated with the persistence of AP.

Diagnostic methods

Diagnosis of CGA should be based on several of the following criteria:

- morulae within the neutrophil leukocytes;
- four fold increase in antibody titer;
- positive PCR from peripheral blood;
- typical clinical signs and laboratory abnormalities (Carrade et al., 2009; Ravnik et al., 2011).

Most commonly employed method of diagnosis is the microscopy of the peripheral blood smear and observation of the morulae within the cytoplasm of the neutrophils. It should be noted, that morphology of the morulae is not specific for AP and that ricketsemia is relatively short (<28 days) (Melter et al., 2007; Granick et al., 2009; Canelas Domingos et al., 2011). More specific diagnosis can be obtained with PCR and/or serology. To identify AP the most commonly amplified gene is the 16S rRNA gene (Kybicova et al., 2009; Canelas Domingos et al., 2011). It should be noted that by PCR proves the presence of AP DNA that is not sufficient to prove an active infection or disease, therefore the presence of the clinical signs is important.

Serology most often detects IgG antibodies, that in acute infections (< 8 days) can be below the detection limit of the test. Antibody titer remains high for 6-8 months after the infection. Acute infection would be characterized by at least 4x increase in the antibody titer (Carrade et al., 2009).

In our study of the clinical CGA we employed several of the above mentioned criteria.

Treatment

CGA is successfully treated with doxycycline 5mg/kg every 12 hours for 2 weeks. Clinical signs improve within the next 24 hours after treatment (Carrade et al., 2009).

Borreliosis

Borreliosis in Latvia is caused by several species of borrelia that are combined under the genogroup *B.burgdorferi* sensu lato (BB) (Ranka et al. 2004). BB are motile, thin spirochetes, 15-30 µm in length and 0.2-0.3 µm in thickness (Straubinger 2000). Borreliosis has been diagnosed in dogs, cats, horses, cattle. The most potent vectors are adult ticks that mostly acquire borrelia from feeding on small rodents or birds; dogs and humans, like with CGA are considered accidental hosts.

It is noteworthy that in countries where human borreliosis is endemic (Sweedeen, USA) relatively low number of dogs are seropositive, even more so, clinical disease is quite rarely observed (Egenvall et al., 2000a; Pejchalova et al., 2006; Pantchev et al., 2009; Kovalcuka et al., 2011).

In Latvia BB have been detected in *I. ricinus* and *I. persulcatus* ticks and human borreliosis is frequently diagnosed throughout the country (Ranka et al., 2004; Bormane, 2007).

Pathogenesis and clinical signs

The temperature of the tick increases after a blood meal, this change activates borrelia in the midgut of the tick and they start to migrate through the gut epithelium to the salivary glands of the tick and thereafter to the organism of the host (Straubinger, 2000). Borrelia multiply at the tick-bite site and then spread into the tissue (Bormane, 2007). The detailed information on the incubation period is included in the Table 2.

In naturally infected dogs borreliosis mostly is associated with arthritis, anorexia and fever (Skotarczak et al., 2003). In rare cases kidney, heart and nervous system can be affected (Agudelo et al., 2011). In experimentally infected animals only arthritis has been noted (Halperin, 2011; Straubinger, 2011).

It is important to note, that most of the naturally infected dogs are able to resolve the infection without showing any clinical signs. The factors that affect clinical manifestation of the disease are not known (Straubinger, 2011). Although rare, borreliac nephropathy is lethal, it is characterized by immunemediated glomerulonephritis, lymphoplasmacytic interstitial nephritis and necrosis of the canaliculi (Gerber et al., 2007, Gerber et al., 2009). Clinically dogs show signs of renal insufficiency – dehydration, vomiting, lethargy, polyuria, polydipsia, weight loss. The cardiac form of the disease is very rare and associated with the impaired impulse conduction and bradycardia. The neurological form has been characterized by facial paralysis, aggression and fits (Straubinger, 2011). Eritema migrans skin lesions observed in 50% of human borreliosis cases have not been observed in dogs (Straubinger 2000, Bormane, 2007).

Diagnostic methods

Diagnosis of borreliosis is difficult since clinical signs are unspecific. Multiple of factors need to be assessed including the epidemiological situation in the particular area and additional laboratory testing might be necessary (complete blood count, serum biochemistry, serology, urine analysis, x-ray and synovial fluid analysis).

It is important to remember, that the presence of specific antibodies is not an evidence of an active infection, and can also be related to a vaccination. Both borrelia and antibodies have been known to persist within the organism for several years, but active immunity that follows the infection is rather short (Straubinger 2000). Upon choosing the serological test, one should note, that only those that detect C6 antigen are able to distinguish between infection and vaccination (Straubinger, 2011). The test that we used in our study (IDEXX Canine SNAP 4Dx test) detects C6 antigen. Since clinical signs of borreliosis and CGA overlap we opted to combine these dogs in the sick dog group.

Treatment

Several antibiotics can be chosen to treat borreliosis (doxycycline, amoxiciline, ceftriaxone, azitromycine), but none can guarantee complete eradication of the borrelia (OIE). Due to the slow reproduction antibiotics should be continued for 3-4 weeks (Littman et al., 2006). Symptomatic treatment with corticosteroids, anti-inflammatory agents or omega-3 fatty acids might be necessary in some cases (Littman et al., 2006). The use of corticosteroids should be monitored closely, since in rare cases prednisolone treatment was associated with recidive of the acute borreliosis (Straubinger, 2000).

Babesiosis

Babesia are protozoans belonging to the genus babesiae (Hunfeld et al., 2008; Ayooob et al., 2011; Solano – Gallego and Baneth, 2011). The parasites are defined

according to the size of the sporozoites as large (2.5-5.0µm) and small babesia (1.0-2.5µm). Dogs in Europe mostly get infected with three species of large babesia – *B. canis canis* (BC), *B. canis vogeli*, *B. canis gibsoni*.

Until the beginning of our study in 2009, veterinarians in Latvia did diagnose babesiosis, but it was not clear whether dogs were infected in Latvia or while travelling and what species of babesia was causing the disease (Buivide-Zvīdriņa, 2009).

Lately by employing PCR methods new babesial species have been found in geographical areas that have been considered free of this disease previously (Hunfeld et al., 2008; Øines et al., 2010). Canine babesiosis caused by BC have been diagnosed in Norway, Russia, Poland, Germany, Netherlands and in several countries in Southern Europe (Solano – Gallego and Baneth, 2011, Øines et al., 2010; Adaszek et al., 2011). Other two large babesia species mostly infect dogs in Southern countries (Solano – Gallego and Baneth, 2011).

Ticks in Latvia contain the following babesia species: *B. divergens*, that is especially pathogenic to humans was noted in *I. persulcatus* ticks, *B. bovis* was noted only in *I. ricinus* ticks, but *B. microti* was isolated from both tick species (Bormane, 2007). *Babesia canis canis* up to date has not been isolated from either of these tick species in Latvia (Bormane, 2007).

The life cycle of babesia is well studied, during a blood meal babesial sporozoites are activated and enter the host animal with the tick saliva (Irwin, 2010). Sporozoites infect erythrocytes and develop into trophozoites that form into merozoites whose typical tear-shaped form is easily recognizable under the microscope (Hunfeld, et al., 2008; Ayoob et al., 2010). Information on the incubation period, circulation in the blood and other detailed information is included in Table 2. Via blood meal ticks acquire infected erythrocytes and babesia enters ticks salivary glands and oocytes. In the host animal babesia infect exclusively erythrocytes (Ayoob, et al., 2010).

Pathogenesis and clinical signs

Clinical signs vary with the species of babesia and activity of the host immune system. BC and *B. canis vogeli* are associated with mild clinical signs, while *B. canis rossi* causes severe disease. Clinical signs of babesiosis are related to the hemolytic anemia and systemic inflammatory reaction syndrome that can result in damage of multiple internal organs (Solano–Gallego and Baneth, 2011). Hemolytic anemia in babesiosis results from:

- mechanical damage to the erythrocyte membrane;
- formation of antierythrocyte antibodies and complement binding and subsequent lysis of the erythrocytes;

- changes in the metabolism of the infected erythrocytes, that result in decreased membrane stability (Solano–Gallego and Baneth, 2011).

Anemia, hypotension, blood stasis and increased concentration of carbon dioxide result in hypoxia that plays an important role in the pathogenesis of babesiosis (Ayoob, et al., 2010).

Clinical signs of babesiosis vary from mild to severe and there is no correlation with the degree of parasitemia (Ayoob, et al., 2010). Hemolytic anemia due to babesiosis clinically is presented with fever, pallor, anorexia, lethargy, splenomegaly, tachycardia (Solano–Gallego and Baneth, 2011). In the majority of sick dogs laboratory analysis reveal thrombocytopenia, hyperfibrinogenemia, nonregenerative anemia of variable severity together with hemolysis, neutropenia and hemoglobinuria (Kirtz et al., 2012; Ayoob et al., 2010).

Diagnostic methods

Microscopy and the direct identification of the babesia in the stained peripheral blood smear is the most commonly used method of diagnosis (Ayoob et al., 2010). This method is specific, but it has low sensitivity in cases of low parasitemia, therefore it is imperative to perform a complete blood count and analysis (Kirtz et al., 2012). PCR testing can aid in diagnosing cases with low parasitemia and to distinguish between different species of babesia (Kirtz et al., 2012). In our study we performed both direct identification of the babesia and molecular methods to obtain information on the species of the isolated babesia.

Treatment

The recommended treatment of BC babesiosis consists of single dose 5-6.6 mg/kg of imidocarb dipropionate via intra-muscular injection; that if necessary can be repeated after 14 days. Clinical signs in most of the cases declain within 24 hours of the treatment. Frequently symptomatic treatment is needed to support the dog, especially important is the fluid therapy, blood transfusion and anti-inflammatory drugs. In cases where specific treatment is not effective immune mediated hemolytic anemia should be ruled out. In some cases dogs can overcome the disease without specific treatment (Ayoob et al., 2010).

Prophylaxis of the tick borne diseases

Prophylaxis is a complex task that involves cutting the lawn and bruswood, accaricide use on the dogs and removal of the ticks among other measures (Straubinger, 2000; Foil et al., 2004; Randolph 2010). Several environmental factors play an important role in the optimal development of the ticks: number of the small mammals (small rodents for example) that feed the nymphs and larvae, temperature and humidity. It is now accepted that the climate changes (longer summers, higher

humidity etc) benefits the ticks and also makes the contact between the tick, pathogen and host more common (Gray et al., 2009).

Being a working dog or outdoor dog is considered an increased risk of TBD (Rand et al., 1991; Krupka et al., 2007; Carrade et al., 2009; Wu et al., 2009). Dog owners are surveyed in order to assess the impact of the environmental factors on the seropositivity of their dogs (Wu et al., 2009; Kohn et al., 2011).

Vaccination against TBD, is non-existent (CGA) or provides limited or poor protection in cases of borreliosis and babesiosis; however, this is an active field of research (Straubinger 2000; Schuijt et al., 2011).

MATERIALS AND METHODS

Methodology and sample collection plan was approved by the Ethics Committee of the Latvian Food and Veterinary Service. Detailed information on the reagents and laboratory protocols can be obtained from the original publications. General structure of the thesis can be seen in Figure 1.

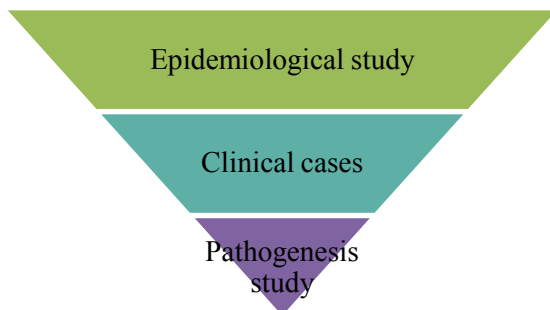


Figure 1. The structure of the study.

Study has three parts: (1) epidemiological study, (2) analysis of the clinical cases and causative agents, (3) study on the pathogenesis of CGA.

Throughout this summary section materials and methods will be described in the following order- firstly those used in the epidemiological study, followed by those used to study the clinical diseases and their pathology. Publication that contains the specific methodology will be denoted by Roman numerals (I-V publication).

Study population - dogs (I-IV publication)

In the epidemiological study that was carried out in 2009-2011, we included 473 dogs from Latvia, they were divided into the following subgroups:

- clinically healthy pet dogs (n=400);
- clinically healthy hunting dogs (n=41);
- dogs with clinical signs of CGA and/or borreliosis (n=29). The clinical signs and laboratory test abnormalities observed in these dogs consisted of: fever, lethargy, anorexia, painful joints, lameness, anemia, thrombocytopenia;
- dogs that have been diagnosed with babesiosis and have not been outside Latvia in the last 6 months (n=3). Information on these dogs as well as blood sample was submitted by the veterinarians or laboratories in Latvia.

Sampling locations and number of dogs sampled in each site are included in the Figure 2.

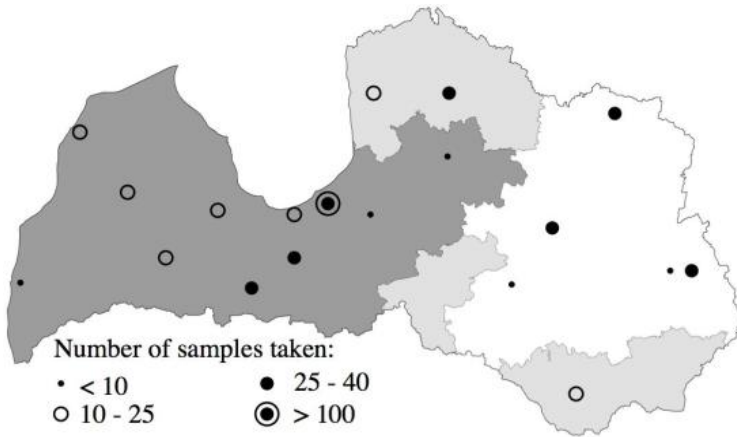


Fig.2. Localization and number of samples analyzed.

Dark grey – *I. ricinus*, white – *I. persulcatus* habitat, light gray – areas with both tick species. (Tick habitat information from Bormane, 2007).

Samples from clinically healthy dogs were taken in collaboration with veterinarians throughout Latvia or during field trips by the researcher (IB). Clinically healthy pet and hunting dogs were sampled, both in rural (N=321/441) and urban areas (N=120/441) and in three different tick habitats (Figure 2).

In collaboration with small animal veterinarians we obtained samples from the dogs that had clinical signs of TBD or were diagnosed with babesiosis. Dogs of various breeds, age groups, both male and female dogs were included in the study.

Survey (II publication)

Owners (n=400) of the clinically healthy pet and hunting dogs filled the survey (appendix 2). The data obtained was used to correlate the various environmental factors with the previously detected AP and BB seroprevalence data. We evaluated if the following factors affected the seroprevalence:

- household in rural or urban area;
- number of dogs in the household;
- use of the acaricide (yes/no, type of acaricide, frequency of the use);
- tick bite (yes/no, number of ticks (at one time point), season when tick bites are the most common).

Data on the tick species habitat (I, III, IV publication)

Data on the tick species residing in Latvia were obtained from the PhD thesis (Bormane, 2007). Depending on the tick species we divided Latvia in three regions: I ricinus region (IR) where the majority of ticks are of this species; *I. persulcatus* region (IP) and mixed region (M), where both species of ticks have been found. Sampling of clinically healthy dogs was planned to cover all three of these tick regions: IR region (N= 272/441), IP region (N=93/441), M region (N=76/441).

Hematology and serology (I-IV publication)

Two to five milliliters of peripheral blood from 473 dogs was drawn into anticoagulant EDTA tubes. Immediately after the blood collection a blood smear was prepared, air dried and stained with modified Wrights Giemsa stain.

Hematology analyzer was used to detect total white blood cell, erythrocyte and thrombocyte count. Blood smears were evaluated microscopically, 200 white blood cell differential was performed as well as morphology and presence of blood parasites was assessed.

All the dogs involved in the study (n=473) were evaluated serologically. Whole blood was used in the SNAP 4Dx test according to the manufacturers instructions. This test is an enzyme linked immunosorbent assay that detects IgM and IgG against AP membrane protein p44/msp2, Ehrlichia canis proteins p30 and p30-1, BB C6 protein. This test also detects antigen of *Dirofilaria immitis*. The sensitivity and specificity of this test is high for all the pathogens (Beall et al., 2008; Pantchev et al., 2009; Chandrashekar et al., 2010; Couto et al., 2010; Carrade et al., 2011).

Nested PCR for detection of *A. phagocytophilum* and *B. canis* in the blood samples from sick dogs (I, IV publication)

Etiological diagnosis was obtained by the use of nested PCR (nPCR). The dogs that confined to the following criteria were analyzed:

- AP 16S rRNS gene was amplified in the sick dogs (n=10) with thrombocytopenia (platelets $<50 \times 10^9/L$) and or morulae within the neutrophile leukocytes;
- BC 18S rRNS gene was amplified in dogs that were microscopically diagnosed with babesiosis (n=3).

We performed sequencing of the isolates and compared our sequences with those deposited in the GenBank and subsequently deposited our sequences in the GenBank (addendum 3).

Skin biopsies (V publication)

Our aim was to gain more information on the pathogenesis of CGA and to investigate if AP can be isolated from the lesional skin biopsies from AP

seropositive dogs. We selected formalin fixed, paraffine embeded skin biopsies (n=65) from the archive at the Vetsuisse Faculty, Bern, Switzerland.

Skin biopsies were taken from three groups of dogs:

- dogs with clinical skin problems and known serological status:
 - AP seropositive dogs that responded to treatment with doxycycline, histopathologically the skin lesions did not correspond to any known entity (52 biopsies from 12 dogs);
 - AP seronegative dogs that responded to treatment with doxycycline, histopathologically the skin lesions did not correspond to any known entity (2 biopsies from 2 dogs);
- dogs with histologically diagnosed tick bite, the serological status of these dogs is unknown (11 biopsies from 10 dogs).

cPCR for detection of *A. phagocytophilum* in formalinized skin biopsies (V publication)

Conventional PCR (cPCR) was used to amplify 16S rRNA encoding gene of AP from the formalinized skin biopsies. Laboratory protocol has been described in detail in the V publication. The isolated sequences of AP we compared to those deposited in the GenBank.

Immunohistochemistry for detection of *A. phagocytophilum* in formalinized skin biopsies (V publication)

Immunohistochemistry was used to show the exact localization of AP within the the cPCR positive skin biopsies (n=8). We used monoclonal (mouse-anti-MSP2) and polyclonal (rabbit – anti- *A. phagocytophilum*) antibodies and 3-amino-9-ethylcarbazole substrate (AEC) for antigen-antibody complex detection

Statistical analysis

NCSS software was used for statistical analysis (NCSS, 2007, Jutah, USA).

The number of healthy dogs to be included in the study we established by analyzing the seroprevalence in the neighbouring countries and the expected seroprevalence in the dogs in Latvia. The number 441 was adequate to reach the statistical significance of 95%.

We used both parametrical (Student test) and nonparametrical tests (median, mean, Mann-Whitney U test, Fisher exact test, odds ratio (OR) with the confidence interval (CI) of 95%). Statistical difference was set at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Seroprevalence against *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* s.l. (I, III publication)

The examined dogs in Latvia had seroconverted and had antibodies against AP and BB (Table 3). Relatively high AP seroprevalence (11%) indicates that AP infection is quite common in Latvian dogs. We observed that AP seroprevalence was not higher in dogs with clinical signs of TBD ($p>0.05$) and there was no difference between hunting and pet dogs ($p=0.833$).

Table 3

Anaplasma phagocytophilum and *B. burgdorferi* s.l. seroprevalence in Latvian dogs

	Clinically healthy pet (n=400)	hunting (n=41)	Sick (n=29)
AP	11% (44)	12.2% (5)	17.2% (5)
BB	2.7% (11)	0% (0)	0% (0)

Seropositivity in clinically healthy dogs in Latvia is similar to that detected in neighbouring countries: in Sweden 17% in Poland 21% of dogs were seropositive (Egenvall et al., 2000a; Engvall and Egenvall 2002; Welc-Faleciak et al., 2009). Lack of difference in seropositivity among clinically healthy and sick dogs was also noted in other studies (Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2011). It can be explained by the long persistence of the antibodies after the resolution of the clinical signs of CGA or with the fact that in the sick dog group acutely infected dogs might be included and in those dogs antibody titers might be below the detection limit (Carrade et al., 2011; Egenvall et al., 2000a; Pantchev et al., 2009; Rand et al., 2011; Poitout et al., 2005). Sick dogs with thrombocytopenia we evaluated with the nPCR (n=10), this test was positive in one dog that also had morulae within the neutrophils. Thus we can assume that our detected seroprevalence in the sick dogs was accurate and none of the dogs had acute disease.

BB seroprevalence (Table 3) is unexpectedly low, given that borreliosis is endemic in humans in Latvia (Ranka et al., 2004). Seroprevalence is similar to that detected in Sweden (3.9%), Czech republic (6.5%) and France (1.09%) (Egenvall et al., 2000a; Pejchalová et al., 2006; Pantchev et al., 2009). It is noteworthy that 36% of BB seropositive dogs also had antibodies against AP (Figure 3). Overall we conclude that BB seroprevalence in dogs in Latvia is low and seropositive dogs frequently co-express antibodies with AP.



Fig. 3. *B. burgdorferi* seropositive dogs and dogs that co-express antibodies against *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum*.

I. ricinus habitat (dark grey, IR), *I. persulcatus* habitat (white, IP), both tick species reside in (M) light grey areas.

We did not perform nPCR in clinically healthy dogs. Co-expression of the antibodies against several of the TBD agents has been described and it is explained by the fact that ticks can carry several pathogens (Gal et al., 2007; Beall et al., 2008; Pantchev et al., 2009).

Overall we conclude that the most commonly encountered TBD in dogs in Latvia is granulocytic anaplasmosis caused by *A. phagocytophilum*.

Factors affecting the seroprevalence of *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* s.l.

***I. ricinus* and *I. persulcatus* tick habitat (I,III publication)**

Two tick species are epidemiologically important and for years have had a distinct habitats within the country (Bormane et al., 2004; Bormane 2007; Karelis et al., 2012). We used this information to analyze if seroprevalence in dogs against AP and BB could be affected by the tick species that reside in the particular area. The tick habitat and obtained seropositivity against AP is depicted in Figure 4.

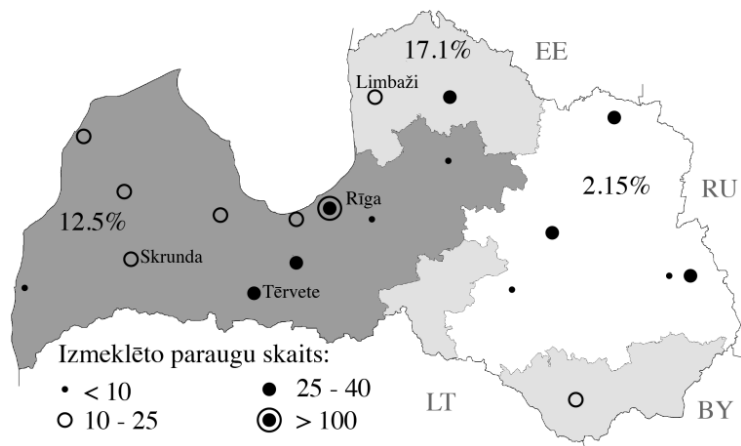


Fig. 4. Dogs seropositive against *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* (dark grey), *I. persulcatus* (white) and mixed tick species regions (light grey).

The AP seroprevalence in dogs from IR region was 12.5% (34/272), while that in IP region it was significantly lower 2.2% (2/93) ($p=0.003$). In the M regions 17.1% (13/76) dogs were AP seropositive, that was significantly different from the seroprevalence noted in the IP region ($p=0.0005$), but was not different from the seroprevalence in IR region ($p>0.05$).

We detected several areas of very high seropositivity in Tervete 39.4% (13/33), Skrunđa 18.8% (3/16) and Limbaži 18.5% (5/27) of clinically healthy dogs had antibodies against AP (Figure 4).

Our finding that seroprevalence against AP is more common in IR versus IP habitat is unique. Information on the places where especially large number of dogs are seropositive could be useful to the human health specialists, since dogs are a sentinels of human granulocytic anaplasmosis (Carrade et al., 2009).

Due to low numbers of BB seropositive dogs, we could not obtain similar statistically significant results. But it is easy to see similar trend for these cases to be located in the IR or M regions (Figure 3).

Household, tick attachment, acaricide use (II publication)

By analyzing the survey results we observed that AP seropositivity is higher with the following factors:

- rural household and tick bite in the autumn ($p<0.05$);

The following factors were not significantly associated with the higher odds of being AP seropositive:

- households with two or more dogs (OR 0.33, 95% CI=0.15-0.74). In our study all such households were in the rural areas;
- attached more than 10 ticks at once (OR 0.13, 95% CI= 0.007-2.34).

Statistical analysis of our data revealed that the use of acaricides on the dogs did not affect the AP seropositivity. Higher seroprevalence in rural dogs has been explained by the increased contacts with the ticks (Rand et al. 1991; Krupka et al. 2007; Carrade et al. 2009, Wu et al. 2009). This fact contradicts our previous results that similar percentage of hunting and pet dogs had antibodies against AP. This discrepancy might be associated with relatively low number of evaluated hunting dogs. Association between the seropositivity and tick attachment in autumn can be explained by the greater adult tick activity in this particular season (Carrade et al., 2009). The association of acaricide use and the seropositivity is equivocal since both protective (Blagburn et al. 2005) and no effect have been described in the literature (Wu et al. 2009; Kohn et al. 2011; Rand et al. 2011). It should be noted, that this information might be biased or incorrect, since it was obtained in the dog owner survey (Hamer et al., 2009).

Due to the low number of BB seropositive dogs we could not perform statistically robust analysis for these dogs.

Clinical cases of tick-borne diseases

Canine granulocytic anaplasmosis (1 publication)

We diagnosed first CGA case in 8 years old, female, mixed breed dog Foksa. It was brought to the veterinarian with complaints of fever (rectal temperature 41°C), lethargy, anorexia. Hematology analysis revealed moderate leukocytosis 23.2 (6-17x10⁹/L), severe thrombocytopenia 40 (200-500 x 10⁹/L) and normal erythrocyte count 6.26 (5.5-8.5 x 10¹²/L). Upon microscopy of the blood smear it was discovered that 5% of neutrophils had intracytoplasmic morulae (Figure 5). Serologically dog had AP and Ehrlichia canis antibodies.

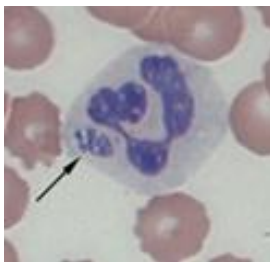


Fig.5. Erythrocytes and neutrophil with intracytoplasmic

A. phagocytophilum (arrow) inclusion. Wrights Giemsa, 10x100. (Foto Blueperlvvet)

Ehrlichia canis seropositivity was caused by crossreactivity between the AP antibodies in the serum and *E. canis* antigen on the test pad (Bormane, 2007; Carrade et al., 2009; Carrade et al., 2011; Pantchev et al., 2009). By nPCR we amplified 546 base pair long segment of AP 16Sr RNA gene and thus we confirmed that only AP infection was the cause of the disease (Figure 6).

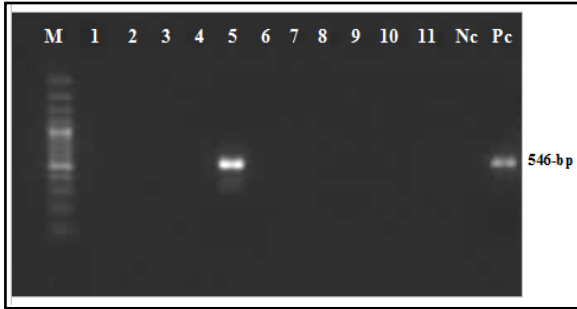


Fig.6. Agarose gel with amplified *A. phagocytophilum* 16S rRNS gene product.

M – molecular marker, 1-11 – canine blood samples, line 5 – positive sample, Nc- negative control, Pc- positive control.

The AP sequence isolated from the sick dog Foksa was 100% similar to that isolated from human and deposited in the GenBank (accession number U02521). It was also genetically identical to that isolated from *I. ricinus* male in Mezaparks, Riga, Latvia (Figure 7). Isolates from ticks were obtained from A. Bormane

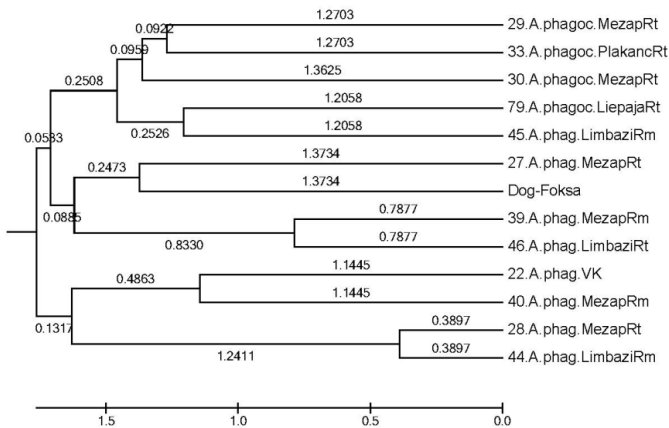


Fig. 7. Phylogenetic relationship of AP isolate from dog with CGA and ticks in Latvia. Rm – *I. ricinus* female, Rt – *I. ricinus* male. Tick isolates from A. Bormane, 2007.

The dog was treated with doxycycline and on the third day clinical signs improved. The isolated sequence was deposited in the GenBank under the accession number JQ966109 (reprint from the GenBank in the 3. addendum)

Babesiosis (IV publication)

In this study we evaluated 3 dogs that had not travelled outside Latvia and were diagnosed with babesiosis. We performed hematological, serological and molecular analysis as well as compared information on the clinical signs, laboratory abnormalities, treatment and outcome in these three cases with that published in the scientific literature.

Erythrocytes of all three dogs contained large babesia, by cPCR we amplified 18S r RNA gene of the *B. canis canis* after the sequencing the isolates proved to be 98-100% identical to those deposited in the GenBank.

Clinical signs and laboratory abnormalities observed in the 3 Latvian dogs are similar to those described in the literature (Table 4) (Ayoob et al., 2010).

Table 4

Signalment, clinical signs, treatment and outcome in three Latvian dogs with babesiosis

Parameters	Dog 1	Dog 2	Dog 3
Breed, age (years), sex	Dartha, 7, M	Golden Retriever, 4, F	Mongrel, 3, M
Location/ tick species	Liepaja/ <i>I. ricinus</i>	Riga / <i>I. ricinus</i>	Riga/ <i>I. ricinus</i>
Clinical signs			
Fever	yes	yes	yes
Lethargy	yes	yes	-
Anorexia	yes	-	yes
Laboratory abnormalities			
Anemia	moderate	mild	severe
Thrombocytopenia	severe	severe	severe
Hemolysis	yes	yes	yes
AST, ALT	mild ↑	mild ↑	moderate ↑
Additional information			
Treatment	blood transfusion, symptomatic	imidocarb dipropionate, symptomatic	symptomatic
Complications	possible hemoglobin nephrotoxicity	No	No
Outcome	died	recovered	recovered

↓↑- decrease or increase of the analyte; - not observed or test not performed; AST – aspartat aminotransferase, ALT – alanine aminotransferase*

BC isolates from Latvian dogs were similar to those isolated from dogs elsewhere in Europe (Solano–Gallego and Baneth, 2011, Øines et al., 2010). Isolate from Dog 3 had AG→GA inversion in the position 150, when compared to other two isolates. Similar nucleotide inversion was described in BC isolated from a dog in Poland, it is unclear if this inversion has any effect on the pathogenicity of the babesia (Adaszek et al., 2011).

BC isolates from the Latvian dogs were deposited in the GenBank with the following accession numbers JX227980 (dog 1), JX227981 (dog 3). The sequence of Dog 2 was similar to that of dog 1, but shorter, thus we did not submit it to the GenBank (reprints from the GenBank are in 3.adendum).

Since BC has not been isolated from ticks in Latvia we can only speculate on the routes of the infection in these three dogs:

- import of the infected tick (for example with migrating birds);
- the expansion of the typical vector *Dermacentor reticulatus*;
- BC adaptation to the IR or IP (Rar et al., 2005; Cieniuch et al., 2009; Menn et al., 2010; Øines et al., 2010; Lempereur et al., 2011).

Overall we conclude that babesiosis in dogs in Latvia is characterized as mild to severe disease, such a variation in the clinical picture should be kept in mind and babesiosis should be included in the differential list in all the dogs with relevant clinical signs.

To summarize the results of the second part of the study we can state that TBD are present in dogs in Latvia and possibly are misdiagnosed due to the unspecific clinical signs or laboratory errors.

A. *phagocytophilum* in seropositive dogs with skin lesions (V publication)

The highest seroprevalence in dogs in Latvia was against AP. In addition it is an interesting infection that has been studied in Northern Europe (Egenvall et al., 2000b; Egenvall et al., 2000a; Granquist et al., 2010), thus we chose to perform a study on the pathogenesis of this disease.

We amplified AP 16S rRNA gene in 8/65 biopsies from 24 dogs, all of the PCR positive dogs were also seropositive. Sequences of the AP isolates were 100% identical to the prototype AP isolate from human (U02521). Our sequences were deposited in the GenBank with the following accession numbers KC119573, KC119574 and KC119575 (reprints from the GenBank in the 3.adendum).

All PCR positive dogs has high serology titers 1:320, 1:800, 1: 200 un 1:2048, they are similar to those observed in dogs with CGA and skin lesions (Ravnik et al., 2008).

Histological changes observed in the PCR positive skin biopsies are listed in the Table 5.

Table 5.

Skin lesions in PCR positive dogs

Nr.	Skin lesion	Morphological diagnosis
1	Erythema, pustules, macules	Vasculopathy, multifocal, necrotic foci within dermis and epidermis. Dermatitis, neutrophilic, lymphocytic, plasmacytic, superficial, perivascular to interstitial, mild.
2	Edema	Hair follicle arrest with follicular atrophy, dermal edema, moderate.
3	Erythema, scaling	Vasculopathy with deep dermal edema and focal hemorrhages. Dermatitis neutrophilic, plasmacytic, with focal mast cells and eosinophils, perivascular to interstitial, moderate.
4	Erythema, macules	Dermatitis, neutrophilic, eosinophilic, lymphocytic, perivascular to interstitial with severe leukocytostasis.

Due to the low number of PCR positive biopsies we could not associate positivity with any specific macroscopic or microscopic change. Histopathologically the changes in the PCR positive biopsies were variable. Frequently epidermal hyperplasia, mild to severe edema and subepidermal hemorrhages were observed along with multifocal infiltrates of the inflammatory cells around the adnexal structures of the dermis (Figure 8).

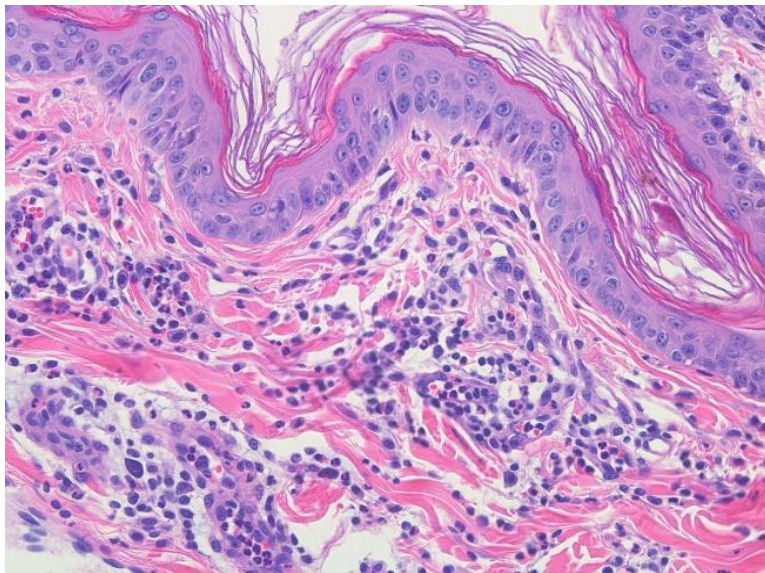


Fig.8. Histological appearance of a skin biopsy from *A. phagocytophilum* seropositive and PCR positive dog.

Note the moderate perivascular inflammatory infiltrate in the dermis which is composed of plasma cells and lymphocytes with fewer numbers of eosinophils, mast cells and rare neutrophils. Blood vessels are lined by activated endothelial cells and filled with numerous neutrophils. Moderate dermal edema is also present. Hematoxylin and eosin, magnification 200x.

The use of either monoclonal or polyclonal antibodies with our IHC protocol did not result in positive AP staining. Negative IHC with positive PCR from the skin biopsies was obtained in a human granulocytic anaplasmosis case (Halaz et al., 2005). But in naturally infected lambs both tests PCR and IHC were positive (Granquist et al., 2010). Negative IHC result can be explained by the smaller amount of tissue examined by IHC compared to PCR.

We conclude that AP isolation from the skin biopsies supports the hypothesis that it could persist in the skin.

CLOSING REMARKS

Our study revealed that TBD and granulocytic anaplasmosis, borreliosis and babesiosis in particular, are important infectious diseases in dogs in Latvia. Seroprevalence against AP and BB is similar to that in Northern and Eastern Europe. The information on the factors that are associated with increased seroprevalence will

be useful for veterinarians in the veterinary clinics and will help to evaluate the public health risk of TBD. Thanks to this study many dog owners and veterinarians are better informed on the TBD. During this study we have generated several ideas that could be studied in the future. Now we work on the evaluation of the ticks that have been collected from dogs.

CONCLUSIONS

1. Highest seroprevalence indogs in Latvia was detected against *A. phagocytophilum* (11.1%). Dogs with clinical signs of granulocytic anaplasmosis had seroprevalence of 17%, that was not significantly different from healthy dogs. Less frequently antibodies against *B. burgdorferi* s.l. were detected (2.5%). Antibodies against *B. burgdorferi* s.l. were not observed in dogs with clinical signs of TBD.
2. In regions inhabited by *I. ricinus* ticks (Western and Central Latvia) *A. phagocytophilum* seropositivity was significantly higher ($p=0.003$) than in *I. persulcatus* regions (Eastern Latvia). Due to low number of *B. burgdorferi* s.l. seropositive dogs we could not assess the association with the tick species.
3. Rural household is a risk factor for *A. phagocytophilum* seropositivity. Risk was also higher if ticks were attached in the autumn. Number of dogs in the household, number of attached ticks and hunting were not associated with increased seropositivity Due to low number of *B. burgdorferi* s.l. seropositive dogs we could not assess the association with the tick species.
4. Clinical cases of canine granulocytic anaplasmosis and babesiosis were diagnosed and described. The sequences of the isolated agents were deposited in the GenBank. Autochthonous babesiosis cases have been diagnosed in dogs in Latvia. Thus we can suspect that *B. canis canis* has adapted to be transmitted by Ixodes ticks in Latvia.
5. *A. phagocytophilum* DNA can be isolated from lesional skin biopsies of seropositive dogs. This fact supports the hypothesis of the skin as a site of persistence of anaplasma.

RECOMMENDATIONS FOR PRACTITIONERS

1. Dogs presenting with fever, lethargy, thrombocytopenia should be tested for granulocytic anaplasmosis, babesiosis and borreliosis.
2. In dogs with immune mediated hemolytic anemia and lethargy babesiosis should be excluded.

3. In *A. phagocytophilum* seropositive dogs with skin lesions and response to doxycycline persistent canine granulocytic anaplasmosis should be considered.
4. TBD should be diagnosed based on the complex approach including clinical signs, anamnesis, hematology, serology and molecular testing, hematology is especially useful and cost effective way of diagnosing TBD.
5. We encourage the veterinarians to inform their clients on the complex measures needed to lower the tick burden.
6. Veterinarians and human health specialists should make note on the areas with high presence of *A. phagocytophilum* seropositive dogs within the *I. ricinus* habitat (Tervete, Limbazi, Skrunda).

INFORMĀCIJAS AVOTI/ LITERATURE

1. Adaszek L., Carbonero, Martinez A., Winiarczyk S. (2011) The factors affecting the distribution of babesiosis in dogs in Poland. *Veterinary Parasitology*, Vol. 181, p.160-165.
2. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 215, p. 403-410.
3. Ayoob A.L., Hackner S.G., Prittie J. (2010) Clinical management of canine babesiosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)*, Vol. 20, p. 77-89.
4. Agudelo C.F., Schanilec P., Kybicova K., Kohout P. (2011) Cardiac manifestations of borreliosis in a dog: a case report. *Veterinari Medicina*, Vol. 56, p. 85-92.
5. Baneth G., Bourdeau P., Boudoiseau G., Bakken J.S., Krueth J., Wilson-Norskog C., Tilden R.L., Asanovich K., Dumler S.J. (1996) Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of American Veterinary Association*, Vol. 275, p.199-205.
6. Bowman D., Breitschwerdt E., Capelli G., Cardoso L., Dantas-Torres F., Day M., Dedet JP., Dobler G., Ferrer L., Irwin P., Kempf V., Kohn B., Lappin M., Little S., Maggi R., Miro G., Naucke T., Oliva G., Otranto D., Penzhorn B., Pfeffer M., Roura X., Sainy, A., Shaw S., Shin S., Solano-Gallego L., Straubinger R., Traub R., Trees A., Truyen U., Demonceau T., Fitzgerald R., Gatti D., Hostetler J., Kilmer B., Krieger K., Mencke N., Mendao C., Mottier L., Pachnicke S., Rees B., Siebert S., Stanneck D., Mingote MT., von Simson C., Weston S. (2012) Vector-borne diseases – constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. *Parasites and Vectors*, Vol. 5, p. 55. DOI 10.1186/1756-3305-5-55
7. Beall M.J., Chandrashekar R., Eberts M.D., Cyr K.E., Diniz P.P., Mainville C., Hegarty B.C., Crawford J.M., Breitschwerdt E.B. (2008) Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and Ehrlichia species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, Vol. 8, p. 455-464.
8. Berzina I., Capligina V., Bormane A., Pavulina A., Baumanis V., Ranka R., Granta R., Matise I. (2012) Association between *Anaplasma phagocytophilum* seroprevalence in dogs and distribution of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus*

ticks in Latvia. Ticks and Tick-Borne Diseases, Vol. 4, No. 1-2, p.83-88. DOI 10.1016/j.ttbdis.2012.08.003

9. Billeter S.A., Spencer J.A., Griffin B., Dykstra C.C., Blagburn B.L. (2007) Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. Veterinary Parasitology, Vol. 147, p. 194-198.
10. Blagburn B.L., Spencer J.A., Butler J.M., Land T.M., Billeter S.A. 2005. Prevention of transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* from ticks to dogs using K9 Advantix and Frontline Plus applied 25 days before exposure to infected ticks. International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, Vol. 3, p. 69-75.
11. Bormane A., Lucenko I., Duks A., Mavtchoutko V., Ranka R., Salmina K., Baumanis V., (2004) Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993-2002. International Journal of Medical Microbiology, Vol. 293, p. 36-47.
12. Bormane A. (2007) *Ixodes ricinus* L. un *Ixodes persulcatus* P.Sch. (Acari: Ixodidae) izplatība, to pārnēsāto infekcijas slimību nozīme un molekulārā epidemioloģija Latvijā. Promocijas darbs. Rīga: [LU]. 82 lpp.
13. Bowman D., Little S.E., Lorentzen L., Shields J., Sullivan M.P., Carlin E.P. (2009) Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based survey. Veterinary Parasitology, Vol. 160, p. 138-148.
14. Buivide-Zvidriņa S. (2009). Suņu babezioze. Veterinārais Žurnāls, Nr. 3, 27.-29. lpp.
15. Canelas Domingos M., Trotta M., Briend-Marchal A., Medaille C. (2011) Anaplasmosis in two dogs in France and molecular and phylogenetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum*. Veterinary Clinical Pathology, Vol .40, p. 215-221.
16. Canine SNAP 4Dx Test kit [online] [viewed 29 February 2012]. Access: <http://www.drugs.com/vet/canine-snap-4dx-test-kit-can.html>
17. Carrade D.D., Foley J.E., Borjesson D.L., Sykes J.E. (2009) Canine granulocytic anaplasmosis: a review. Journal of Veterinary Internal Medicine, Vol. 23, p. 1129-1141.

18. Carrade D., Foley J., Sullivan M., Foley C.W., Sykes J.E. (2011) Spatial distribution of seroprevalence for *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* in dogs in Washington, Oregon, and California. *Veterinary Clinical Pathology*, Vol. 40, p. 293-302.
19. Chandrashekar R., Mainville C.A., Beall M.J., O'Connor T., Eberts M.D., Alleman A.R., Gaunt S.D., Breitschwert 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. *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 71, p. 1443-1450.
20. Chomel B. (2011) Tick-borne infections in dogs – an emerging infectious threat. *Veterinary Parasitology*, Vol. 179, p.294-301.
21. Cieniuch S., Stanczak J., Ruczaj A. (2009) The first detection of *Babesia EU1* and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in northern Poland. *Polish Journal of Microbiology*, Vol. 58, p. 231-236.
22. Couto C.G., Lorentzen L., Beall M.J., Shields J., Bertolone N., Couto J.I., Couto K.M., Nash S., Slack J., Kvitko H., Westendorf N., Marin L., Iazbik C.M., Vicario F.C., Sanz P., Ruano R. (2010) Serological study of selected vector-borne diseases in shelter dogs in Central Spain using point-of-care assays. *Vector-borne Zoonotic Diseases*, Vol. 10, p.885-888.
23. Day M.J. (2011) The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasites and Vectors*, No. 4, p. 48.
24. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dash G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. (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 Systemic Evolutionary Microbiology*, Vol. 51, p. 2145-2165.
25. Ebani V., Cerri D., Fratini F., Ampola M., Andreani E. (2008). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy. *New Microbiologica*, Vol. 31, p. 371-375.
26. Egenvall A., Bonnett N.B., Gunnarsson A., Hedhammar Å., Shoukri M., Bornstein S., Artursson K. (2000a) Sero-prevalence of Granulocytic *Ehrlichia*

- spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Swedish Dogs 1991-94. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Vol. 32, p. 19-25.
27. Egenvall A., Lilliehöök I., Bjöersdorff A., Olsson Egenvall E., Karlstam E., Artursson K., Heldtander M., Gunnarsson A. (2000b) Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. Veterinary Record, Vol. 146, p. 186-190.
 28. Egenvall A., Egenvall A. (2002) Granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses. International Journal of Medical Microbiology, Vol. 291, Suppl 33, p. 100-103.
 29. Foil L.D., Coleman P., Eisler M., Gragoso-Sanchez H., Garcia-Vazquez Z., Guerrero F.D., Jonsson N.N., Langstaff I.G., Li A.Y., Machila N., Miller R.J., Morton J., Pruett J.H. (2004) Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. Veterinary Parasitology, Vol. 125, p. 163-181.
 30. Franzén P., Aspan A., Egenvall A., Gunnarsson A., Karlstam E., Pringle J., (2009) Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection. Journal of Veterinary Internal Medicine, Vol. 23, p. 636-642.
 31. Gal A., Harrus S., Arcohi I., Lavy E., Aizenberg I., Mekuzas-Yisachar Y. (2007) Co-infection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. Canadian Veterinary Journal, Vol. 48, p. 619-622.
 32. Gerber B., Eichenberger S., Wittenbrink M.M., Reusch C.E. (2007) Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese mountain dogs: a possible breed predisposition. Veterinary Research, No. 3, p. 15 doi:10.1186/1746-6148-3-15
 33. Gerber B., Haug K., Eichenberger S., Reusch C.E., Wittenbrink M.M. (2009) Follow-up of Bernese Mountain dogs and other dogs with serologically diagnosed *Borrelia burgdorferi* infection: What happens to seropositive animals? Veterinary Research, No. 5, p. 18. doi:10.1186/1746-6148-5-18
 34. Granick J.L., Armstrong P.J., Bender J.B. (2009) *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). Journal of American Veterinary Medical Association, Vol. 234, p. 1559-1565.
 35. Granquist E.G., AFleksandersen M., Bergström K., Dumler S.J., O Torsteinbø, Stuen S., (2010) A morphological and molecular study of *Anaplasma*

phagocytophilum transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. Acta Veterinaria Scandinavica, Vol. 52, p. 43.

36. Gray J.S., Dautel H., Estrada-Penja A., Kahl O., Lindgren E. (2009) Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 2009 (2009), Article ID 593232, 12 pages, doi:10.1155/2009/593232.
37. Godfrey E.R., Randolph S. E. (2011) Economic downturn results in tick-borne disease upsurge. Parasites and Vectors, No. 4, p. 35. doi: 10.1186/1756-3305-4-35.
38. Halasz C.L.G., Niedt G.W., Kurtz C.P., Scorpio D.G., Bakken J.S., Dumler S.J., 2005. A case of Sweet Syndrome associated with human granulocytic anaplasmosis. Archives of Dermatology, Vol. 141, p. 887-889.
39. Halperin J.J. (2011) Lyme Disease- an Evidence-based Approach. CAB International Oxfordshire. 103 p.
40. Hamer S.A, Tsao J.I, Walker E.D, Mansfield LS, Foster ES, Hickling GJ. (2009) Use of tick surveys and serosurveys to evaluate pet dogs as a sentinel species for emerging Lyme disease. American Journal of Veterinary Research, Vol. 70, p. 49-56.
41. Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford III, S.R., Krause P.J., Persing D.H. (2000) Babesiosis. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 13, p. 451-469.
42. Hunfeld K.P., Hildebrandt A., Gray J.S. (2008) Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. International Journal of Parasitology, Vol. 38, p. 1219-1237.
43. Irwin P.J. (2010) Canine babesiosis. Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice, Vol. 40, p. 1141-1156.
44. Jensen J., Simon D., Murua Escobar H., Soller J.T., Bullerdiel J., Beelitz P., Pfister K., Nolte I. (2007) *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Zoonoses Public Health, Vol. 54, p. 94-101.
45. Karelis G., Bormane A., Logina I., Lucenko I., Suna N., Krumina A., Donaghy M. (2012) Tick-borne encephalitis in Latvia 1973–2009: epidemiology, clinical features and sequelae. European Journal of Neurology, Vol. 19, p. 62-68.
46. Kidd L, Breitschwerdt E. B. (2003) Transmission times and prevention of tick-borne diseases in dogs. Compendium of Continuing Education for Practicing Veterinarians, Vol. 25, p. 742-751.

47. Kirtz G., Meli M., Leidinger E., Ludwig P., Thum D., Czettel B., Köbl S., Lutz H. (2005) *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog: indentifying the causative agent using PCR. Journal of Small Animal Practioner, Vol. 46, p. 300-303.
48. Kirtz G., Leschnik M., Hooijberg E., Tichy A., Leidinger E. (2012) In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe. Tierärztliche Praxis Kleintiere, Vol. 40, p. 87-94.
49. Kohn B., Galke D., Beelitz P., Pfister K. (2008) Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine, Vol. 22, p. 1289-1295.
50. Kohn B., Silaghi C., Galke D., Arndt G., Pfister K. (2011) Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Research in Veterinary Science, Vol. 91, p. 71-76.
51. Kovalcuka L., Eglite J., Lucenko I., Zalite M., Viksna L., Krumina A. (2012) Association of HLA DR and DQ molecules with Lyme borreliosis in Latvian patients. BMC Research Notes 2012, No. 5, p. 438. doi: 10.1186/1756-0500-5-438.
52. Krupka I., Pantchev N., Lorentzen L., Weise M., Straubinger R.K. 2007. Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland. Der Praktische Tierarzt, No. 10, S. 776-788.
53. Kybicova K., Schanilec P., Hulinska D., Uherkova L., Kurzova Z., Specjhalova S., (2009) Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. Vector Borne Zoonotic Diseases, Vol. 9, p. 655-661.
54. Lempereur L., De Cat A., Caron Y., Madder M., Claerebout E., Saegerman C., Losson B. (2011) First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* in Belgium. Vector Borne Zoonotic Diseases, Vol. 11, p. 125-130.
55. Lin M., Rikihisa Y. (2003) Obligatory intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. Cellular Microbiology, Vol.5,p. 809-820.
56. Littman M.P., Goldstein E.R., Labato M.A., Lappin M.R., Moore G.E. (2006) ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis,

- treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol. 20, p.422-434.
57. Melter O., Stehlik I., Kinska H., Volfova I., Ticha V., Hulinska D. (2007) Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a young dog: a case report. *Veterinarni Medicina*, Vol.52, p. 207-212.
58. Menn B., Lorentz, S., Naucke T.J. (2010) Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasites and Vectors*, Vol. 3. doi: 10.1186/1756-3305-3-34
59. Morissette E., Massung R.F., Foley J.E., Alleman R.A., Foley P., Barbet A.F. (2009) Diversity of *Anaplasma phagocytophilum* strains in the USA. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 15, p. 928-931.
60. Nicholson W.L., Allen K.E., McQuiston J.H., Breitschwerdt E.B., Little S.E. (2010) The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends in Parasitology*, Vol. 26, p. 205-212.
61. Pakuls E. (1927) Kā izsargāties no lipīgām slimībām, sakarā ar jaunākajiem pētījumiem par slimību dīglu izplatīšanos un iekļūšanu organismā. *Burtnieks*.
62. Pantchev N., Schaper R., Limousin S., Norden N., Weise M., Lorentzen L. (2009) Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitology Research*, Vol. 105, p.101-113.
63. Parola P., Raoult D. (2001) Ticks and Tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 32, p. 897-928.
64. Paulauskas A., Radzijeuskaja J., Rosef O. (2009) Anaplasma in ticks feeding on migrating birds and questing ticks in Lithuania and Norway. *Clinical Microbiology Infection*, Vol. 15, p. 34-36.
65. Pejchalová K., Žakovská A., Fučík K., Schánilec P. (2006) Serological confirmation of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs in the Czech Republic. *Veterinary Research Communication*, Vol. 30, p. 231-238.
66. Poitout F.M., Shinozaki J.K., Stockwell P.J., Holland C.J., Shukla S.K. (2005) Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 43, p. 796-801.

67. Pusterla N., Berger–Pusterla J., Deplazes P., Wolfensberger C., Müller W., Hörauf A., Reusch C., Lutz H. (1998) Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine granulocytic ehrlichia infection in dogs in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 36, p.3460-3462.
68. Rand P., Smith R., Lacombe E. 1991. Canine seroprevalence and the distribution of *Ixodes daminii* in an area of emerging Lyme disease. *American Journal of Public Health*, Vol. 81, p. 1331-1334.
69. Rand P.W, Lacombe E.H, Elias S.P, Cahill B., Lubelczyk K., Charles B., Smith R.P.Jr. (2011) Multitarget test for emerging Lyme disease and anaplasmosis in a serosurvey of dogs, Maine, USA. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 17, p. 899-902.
70. Randolph S.E. 2010. To what extent has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases? *Veterinary Parasitology*, Vol. 67, p. 92-94.
71. Ranka R., Bormane A., Salmina K., Baumanis V. (2004) Identification of Three Clinically Relevant *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S-23S Ribosomal DNA Spacer Amplicons. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, p. 1444-1449.
72. Rar V.A., Maksimova T.G., Zakharenko L.P., Bolykhina S.A., Dobrotvorskyy A.K., Morozova O.V. (2005) Babesia DNA detection in canine blood and *Dermacentor reticulatus* ticks in southwestern Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, Vol.5, p. 285-287.
73. Ravnik U., Tozon N., Smrdel S.K., Zupanc T.A. (2011) Anaplasmosis in dogs: The relation of hematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. *Veterinary Microbiology*, Vol. 149, p.172-176.
74. Rikihisa Y (2011) Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 24, p. 469-489.
75. Schuijt T.J., Hovius J.W., van der Poll T., van Dam A.P., Fikrig E. (2011) Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge, the future. *Trends in Parasitology*, Vol.27, p. 40-47.
76. Skotarczak B. (2003) Canine ehrlichiosis. *Annales of Agricultural Environment and Medicine*, Vol. 10, p. 137-141.

77. Solano-Gallego L., Baneth G. (2011) Babesiosis in dogs and cats – Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, Vol. 181, p. 148-160.
78. Straubinger, R. K. (2000) Lyme Borreliosis in Dogs [online] [viewed 12.01.2013]. Pieejams: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/straubinger/ivis.pdf
79. Stuen S., Bergström K., Petrovec M., Van de Pol I., Schouls L.M. (2003) Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology*, Vol. 4, p. 692-695.
80. Stuen S. (2007). *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary Research Communication*, Vol. 31, p. 79-84.
81. Stuen S., Bråten M., Bergström K., Bårdsen K. (2008) Cyclic variation in lambs infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Record*, Vol. 163, p. 338-340.
82. Sumilo D, Asokliene L, Bormane A, Vasilenko V, Golovljova I, et al (2007) Climate Change Cannot Explain the Upsurge of Tick-Borne Encephalitis in the Baltic's. *PLoS ONE*, Vol.2, No. 6. doi:10.1371/journal.pone.0000500 Pieejams arī: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0000500>
83. Süss J. (2011) Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia – an overview. *Ticks Tick-Borne Diseases*, Vol. 2, p. 2-15.
84. Vītoliņa S. (1957) Par iniciatīvu no apakšas un atbalstu no augšas. *Cīņa*, 24. decembris.
85. Welc-Fałęciak R., Rodo A., Siński E., Bajer A. (2009) *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Veterinary Parasitology*, Vol. 166, p. 191-198.
86. Wu T.J., Sun H.J., Wu Y.C., Huang H.P. 2009. Prevalence and risk factors of canine ticks and tick-borne diseases in Taipei, Taiwan. *Journal of Veterinary Clinical Sciences*, Vol.2, p. 75-78.

87. Øines, Ø., Storli, K., Brun-Hansen, H. (2010) First case of babesiosis caused by *Babesia canis canis* in a dog from Norway. *Veterinary Parasitology*, Vol. 171, p. 350-353.

PIELIKUMI/APPENDIX

Pielikums 1

Izmantotie reaģenti un aparātūra

Reaģenti un materiāli	Ražotājs	Pielietojums
Rapid Differential Stain Kit	VetOne, USA	Asins uztriepju krāsošana
		AP, BB, E. canis antivielu un D. immitis antigēna noteikšana
BC-2800VET	Diamond diagnostics, USA	Leikocītu, eritrocītu, trombocītu skaita noteikšana
NCSS 2007	Utah, USA	Datorprogramma datu statistiskai apstrādei
Spektofotometrs ND-1000 UV-VIS	NanoDrop Technologies, USA	Izolētās DNS kvantitatīva noteikšana
Reaģenti DNS izdalīšanai no asins paraugiem AP 16S rRNS gēna amplifikācijai	Fermentas Life Sciences, Lithuania	DNS izdalīšanai no asins paraugiem AP 16S rRNS gēna amplifikācijai
Termālais saikleris Mastercycler epgradie	Eppendorf, Germany	PCR veikšana
Praimeri AP 16S r RNS gēna amplifikācijai	Metabion International AG, Germany	AP 16S r RNS gēna amplifikācijai
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Perkin-Elmer, USA	AP 16S r RNS sekvenču analīze
GenBank datubāze	-	Izdalīto ierosinātāju sekvenču analīze
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen, Switzerland	AP 16S r RNS izdalīšanai no ādas biopsijām
Histo-clear	National Diagnostics, Atlanta, USA	Parafīna šķīdināšanai
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Switzerland	AP 16S r RNS izdalīšanai no audu biopsijām
Apl16sF and Apl16sRev	Mycrosynth, Switzerland	
UDG		Kontamināciju izslēgšanai no iepriekš veiktām PĶR reakcijām.
UTP		Kontamināciju izslēgšanai no iepriekš veiktām PĶR reakcijām.
Termālais saikleris Techne TC-512	Witec AG	cPĶR veikšana
6x Loading dye	Promega, USA	Elektroforēzei
RedSafe	iNtRON Biotechnology, Korea	Elektroforēzei

Horizon 58	Life Technologies, Gibco BRL	Elektroforēzei
U:Genius	Syngene, Frederick, USA	DNS vizualizācija UV gaismā
Monoklonālā antiviela(peles-anti- MSP2)	Prof. S. Dumler, Division of Medical Microbiology Department of Pathology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA	IHĶ veikšanai
Poliklonālā antiviela (truša – anti- A. phagocytophilum)	Prof. S. Dumler, Division of Medical Microbiology Department of Pathology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA	IHĶ veikšanai
Streptavidīna biotīna komplekss	Dako, USA	IHĶ veikšana

Izmantoto laboratorijas metožu protokoli

Metodes nosaukums (publikācijas nr.)	Protokols
AP, BB, EC antivienu noteikšana, D. immitis antigēnu noteikšana	Izmantotais protokols ir ņemts no ražotāja sniegtās SNAP 4Dx testa lietošanas pamācības (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA), šis tests ir ELISA tipa tests. Izmeklējamais materiāls antikoagulētas asinis vai asins serums. Divas pīles asiņu tiek ar pipeti iepilinātas stobriņā un pievienots viens piliens 4Dx reaģenta, maisījumu sajauc 10x un iepilina testa kasetē, tam paredzētajā iedobē un nospiež testa kasetes palaidējmehānismu. Asinīm (serumam) plūstot pa testa reakcijas strēmeli antivielas pret konkrēto ierosinātāju saistās ar tā antigēnu, kas iestrādāts testa pamatnē un 10 minūšu laikā, antigēna-antivienu saistīšanās aktivizē testā iestrādāto hromogēnu un antigēna-antivielas komplekss redzams kā zils punkts. Zils punkts parādās arī pozitīvās kontroles laukā. Tests nosaka AP msp4 (membranas virsmas proteīnu 4) ar specifiskumu 94%.; BB C6 proteīnu ar jutību 94%, specifiskumu 99.5% .
AP DNS izdalīšana no EDTA stabilizētām asinīm	Asinis uzglabātas -20°C. Centrifugēšana I (4000 rpm 15 minūtes, 4°C). Sediments lizēts 4x tilpuma lizēšanas buferī

(I)	(0.32 M sukroze, 10 mM Tris-HCl [pH=7.6], 5 mM MgCl ₂ , 1% Triton-X-100) 15 minūtes 4°C. Centrifugēšana I. Sediments skalots vienādā tilpumā lizēšanas bufera. Centrifugēšana I. Sediments šķaidīts 5 ml šūnu suspensijas šķidrumā (25 mM EDTA [pH=8.0], 75 mM NaCl) + 0.5 ml 10% Na dodecilsulfāta un šūnu sagremošanai pievienots 4.5 µl proteināzes K (600 U/ml, 20 mg/ml) 1 h 50°C ūdens vannā. DNS ekstrakcija veikta vienu reizi vienādā tilpumā buferēta fenola (pH=8.0) un vienu reizi hloroformā. DNS precipitācijai pievienots 0.6 ml izopropanola un veikta centrifugēšana 4000 rpm 10 minūtes 4°C. Sediments skalots ledus aukstā 70% etanolā, izžāvēts un atšķaidīts 100 µl 1x TE-bufers (10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH=8.0) uzglabāts -20°C līdz lietots DNS amplificēšanai.
AP 16S r RNS gēna amplifikācija (I, V)	Vadoties pēc Liz et al (2000) publikācijas ar nelielām modifikācijām. PĶR reakcija veikta 50 µl (1x Taq Buferis ar (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.5 mM MgCl ₂ , 200µM no katra nukleotīda, 0.5µM ārējo praimeru primārajai reakcijai vai 0.2µM iekšējo praimeru iekšējai reakcijai, 1.5 U of Taq DNS polimerāzes (rekombinantā), 2µl DNS materiāla primārajai reakcijai vai 2µl primārās PĶR produkta iekšējai reakcijai. Reakciju cikli kā aprakstīts Liz et al (2000) publikācijā, izņemot saistīšanās tika veikta 58 oC. Pozitīvā kontrole (AP Webster strain), negatīvā kontrole – DNS brīvs ūdens. DNS vizualizēta ultravioletajā gaismā pēc elektroforēzes 2% agarozes želejā ar 0.2 µg etīdija bromīda.
AP 16S r RNS gēna sekvenēšana un filoģenētiskā analīze (I)	Amplificētie AP 16S r RNS gēna fragmenti tika sekvenēti izmantojot tiešo praimeru ge9f. Sekvenēšana veikta 25 ciklos sekojošos apstākļos (94oC 30-s, 58oC 15-s, un 60oC 4 min). Sekvenētais materiāls analizēts ar standarta metodēm. Sekvence salīdzināta ar AP prototipu GenBank datubāzē.
AP DNS izdalīšana no parafinā fiksētām ādas biopsijām (V)	DNS ekstrakcijai izmantoti 3-5 griezumi no parafinā ieslēgta suņu ādas biopsiju materiāla. DNS ekstrakcija veikta ar QIAamp DNA FFPE Tissue Kit sekojot ražotāja instrukcijām ar sekojošām izmaiņām – parafina šķīdināšanai izmantots Histoclear un tika lietots dubults proteināzes K apjoms. DNS tika šķīdināta 50 µl bufera.
AP 16S rRNS gēna amplifikācija (V)	cPĶR reakcijas galejais tilpums 50 µl:25 µl Master Mix, 10 pmol katra praamera, 1 µl DNS materiāla, 0.25 µl UDG, 1 µl UTP un 20.75 µl ūdens. Reaģenti tika inkubēti ar UDG 1 stundu istabas temperatūrā. cPĶR protokols kā publicēts (Canelas Domingos et al., 2011). Pēc elektroforēzes 2% agarozes gelā ar 0.2 µg RedSafe, DNS vizualizēta ultravioletajā gaismā. AP pozitīvā kontrole no šūnu kultūras, negatīvā kontrole destilēts ūdens. Amplikoni sekvenēti kā aprakstīts (Ranka et al., 2004).

<p>AP imūnhistoķīmiska noteikšana ādas biopsiju materiālā (V)</p>	<p>No biopsiju blokiem nogriezti 3µm biezi griezumī. Deparafinizācija un rehidrācija veikta, attiecīgi, ksilolā un alkoholā. Endogēnās peroksidāzes inhibēšanai izmantots 1% ūdeņraža peroksidāzes šīdums metanolā (15min). Antigēnu atgūšanai lietots citrāta buferis (pH 6.0) mikroviļņu krāsnī, 95°C, 20 min. Inkubācija ar normālu kazas serumu atšķaidījumā 1:50 5% BSA/PBST 20 min. Primārās antivielas monoklonālā un poliklonālā tika lietotas attiecīgi 1:400 un 1:600 atšķaidījumos 1% BSA/PBST uz nakti 4°C (Granquist et al., 2010). Tika lietota vienādu atšķaidījumu, sugai un antivielas izotipam atbilstoša negatīvā kontrole. Parauga skalošana veikta PBST buferī, kam sekoja 30 min ilga inkubācija ar sugai specifisku sekundāro antivielu, kas saistīta ar Streptavidīna bioīna kompleksu. Pēc skalošanas stikliņi apstrādāti ar 3-amino-9-etilkarbazola substrātu (AEC) 3-5 min, noskaloti krāna ūdenī, krāsoti ar hematoksilīnu. Pozitīvā un negatīvā kontrole – dabīgi inficētu aitu ādas biopsijas.</p>
---	--

Pielikums Nr. 2

EKTOPARAZĪTU KONTROLES APTAUJA dzīvnieku īpašniekiem

Kādi dzīvnieki Jums pieder?	<input type="checkbox"/> suns (norādiet skaitu)		
	<input type="checkbox"/> kaķis..... (norādiet skaitu)		
Kur dzīvo dzīvnieki?	<input type="checkbox"/> pilsētā, dzīvoklī	<input type="checkbox"/> laukos	
	<input type="checkbox"/> pilsētā mājā		
Atzīmējiet divas biežākās pastaigu vietas.	<input type="checkbox"/> ārā netiek	<input type="checkbox"/> laukos	<input type="checkbox"/> pa ārpišētas ceļu
	<input type="checkbox"/> pilsētā pa ielu	<input type="checkbox"/> mežā	<input type="checkbox"/> izlaists mājas pagalmā
	<input type="checkbox"/> pilsētas parkā		
Vai lietojat pretblusu un pretērču līdzekļus?	<input type="checkbox"/> jā - gan pretblusu, gan pretērču		
	<input type="checkbox"/> tikai pret blusām		
	<input type="checkbox"/> tikai pret ērcēm		
	<input type="checkbox"/> nē		
Ja lietojat, tad cik bieži?	<input type="checkbox"/> pavasarī, vasarā un rudenī		
	<input type="checkbox"/> tikai vasarā		
	<input type="checkbox"/> visu gadu		
Kādēļ lietojat pretblusu un pretērču līdzekļus?	<input type="checkbox"/> nepatīk blusas, ērces		
	<input type="checkbox"/> vētārsts ieteica		
	<input type="checkbox"/> lai izvairītos no slimībām		
Vai lietojat pret-blusu un pret-ērču līdzekļus arī mājas tīrīšanas laikā?	<input type="checkbox"/> jā	<input type="checkbox"/> nē	
Kāda veida preparātus esat lietojis/usi? Un kurus uzskatāt par efektīviem?	<input type="checkbox"/> kaklasiksnas -	<input type="checkbox"/> efektīvs	
	<input type="checkbox"/> pilienus - - - -	<input type="checkbox"/> efektīvs	
	<input type="checkbox"/> pūšamos - - - -	<input type="checkbox"/> efektīvs	
	<input type="checkbox"/> šampūnus - - - -	<input type="checkbox"/> efektīvs	
	<input type="checkbox"/> pūderus - - - - -	<input type="checkbox"/> efektīvs	
Ja zināt, lūdzu, uzrakstiet nosaukumu			
Vai esat apmierināts/a ar šo preparātu darbību?	<input type="checkbox"/> pilnībā apmierināts/a		
	<input type="checkbox"/> daļēji apmierināts/a		
	<input type="checkbox"/> neapmierināts/a		
Vai Jūsu dzīvniekam kādreiz ir piesūkusies ērce?	<input type="checkbox"/> nē	<input type="checkbox"/> līdz 10	<input type="checkbox"/> vairāk par 10
Kādā gadalaikā tas notika?	<input type="checkbox"/> pavasaris	<input type="checkbox"/> rudens	<input type="checkbox"/> neatceros
	<input type="checkbox"/> vasara	<input type="checkbox"/> ziema	
Kāda bija Jūsu rīcība?	<input type="checkbox"/> ērci izņēmām mājas apstākļos		
	<input type="checkbox"/> ērci izņēma veterinārajā klīnikā		
	<input type="checkbox"/> ērce pati nokrita pēc laika		
Kurus no zemāk minētajiem slimību ierosinātājiem, jūsprāt, pārnēsā ērces?	<input type="checkbox"/> vīrusus	<input type="checkbox"/> vienšūņus	
	<input type="checkbox"/> baktērijas	<input type="checkbox"/> riketsijas	
Vai zināt, kuras no zemāk nosauktajām ir ērču pārnēsātas infekcijas slimības suņiem?	Anaplazmoze	<input type="checkbox"/> ir <input type="checkbox"/> nav <input type="checkbox"/>	nezinu

Pielikums Nr. 2

Laima slimība (borelīoze)	<input type="checkbox"/> ir <input type="checkbox"/> nav <input type="checkbox"/> nezinu
Babezioze - - - - -	<input type="checkbox"/> ir <input type="checkbox"/> nav <input type="checkbox"/> nezinu
Erlīhoze - - - - -	<input type="checkbox"/> ir <input type="checkbox"/> nav <input type="checkbox"/> nezinu
Listerioze - - - - -	<input type="checkbox"/> ir <input type="checkbox"/> nav <input type="checkbox"/> nezinu
Ērču encefalīts- - - - -	<input type="checkbox"/> ir <input type="checkbox"/> nav <input type="checkbox"/> nezinu

Paldies par sadarbību!

Inese Bērziņa, Veterinārārste,

LLU VMF doktorante

inese.berzina@gmail.com



3. pielikums

Anaplasma phagocytophilum isolate Lv-dog1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JQ966109.1

LOCUS JQ966109 255 bp DNA linear

DEFINITION Anaplasma phagocytophilum isolate Lv-dog1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JQ966109 VERSION JQ966109.1 GI:387965631

SOURCE Anaplasma phagocytophilum

ORGANISM Anaplasma phagocytophilum

Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae; Anaplasma; phagocytophilum group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 255)

AUTHORS Berzina,I., Capligina,V., Bormane,A., Pavulina,A., Baumanis,V., Ranka,R., Granta,R. and Matise,I.

TITLE Association between Anaplasma phagocytophilum seroprevalence in dogs and distribution of Ixodes ricinus and Ixodes persulcatus ticks in Latvia

JOURNAL Ticks Tick Borne Dis (2012) In press

PUBMED 23043871

REFERENCE 2 (bases 1 to 255)

AUTHORS Berzina,I., Capligina,V., Bormane,A., Pavulina,A., Baumanis,V., Ranka,R., Granta,R. and Matise,I.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-APR-2012) Latvian Biomedical Research and Study Center, Ratsupites Str. 1, Riga LV-1067, Latvia

ORIGIN

1 taatgcatag gaatctacct agtagtatgg gatagccact agaaatggtg ggtaaactg
61 tataatcct gcgggggaaa gatttatcgc tattagatga gcctatgta gattagctag
121 ttgtaggggt aaaggcctac caaggcgatg atctatagct ggtctgagag gatgatcagc
181 cacactggaa ctgagatagc gtccagactc ctacggggagg cagcagtgagg gaattattga
241 caatgggcgc aagcc

Babesia canis canis isolate Lv-dog2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX227980.1

LOCUS JX227980 263 bp DNA linear

DEFINITION Babesia canis canis isolate Lv-dog2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JX227980 VERSION JX227980.1 GI:401063426

SOURCE Babesia canis canis

ORGANISM Babesia canis canis

Eukaryota; Alveolata; Apicomplexa; Aconoidasida; Piroplasmida; Babesiidae; Babesia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 263)

AUTHORS Berzina,I., Capligina,V., Baumanis,V., Ranka,R., Cirule,D. Matisē,I.

TITLE Autochthonous babesiosis caused by Babesia canis in dogs in Latvia

REFERENCE 2 (bases 1 to 263)

AUTHORS Berzina,I., Capligina,V., Baumanis,V., Ranka,R., Cirule,D. and Matisē,I.

ORIGIN

```
1 gcaagtctgg tgccagcagc cgcggaatt ccagctccaa tagcgtatat taaacttgtt
61 gcagttaaaa agctcgtagt tgtatitttg cgtagcggg ttgaccattt ggttggttat
121 ttcgttttcg cttttgggaa tttccctttt tactttgaga aaattagagt gtttcaagca
181 gacttttgtc ttgaactact cagcatggaa taatagagta ggacttttgt tctatittgt
241 tggttattga accttagtaa tgg
```

Babesia canis canis isolate Lv-dog3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JX227981.1

LOCUS JX227981 272 bp DNA linear

DEFINITION Babesia canis canis isolate Lv-dog3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JX227981 VERSION JX227981.1 GI:401063427

SOURCE Babesia canis canis

ORGANISM [Babesia canis canis](#)

Eukaryota; Alveolata; Apicomplexa; Aconoidasida; Piroplasmida; Babesiidae;
Babesia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 272)

AUTHORS Berzina,I., Capligina,V., Baumanis,V., Ranka,R., Cirule,D. Matise,I.

TITLE Autochthonous babesiosis caused by Babesia canis in dogs in Latvia

REFERENCE 2 (bases 1 to 272)

AUTHORS Berzina,I., Capligina,V., Baumanis,V., Ranka,R., Cirule,D. Matise,I.

JOURNAL Submitted (24-JUN-2012) Latvian Biomedical Research and Study

Center, Ratsupites Str. 1, Riga, Riga LV-1067, Latvia

ORIGIN

```
1 atggagggc aagtctggtg ccagcagccg cgtaattcc agctccaata gcgtatatta
61 aacttggtgc agtataaaag ctgtagttg tattttgctg ttgacggtt gaccatttg
121 ttggttatt cgtttcgcct ttgggaatt tccttttta ctttgagaaa attagagtgt
181 ttcaagcaga cttttgtctt gaatactca gcatggaata atagagtagg accttggttc
241 tattttgttg gtattgaac cttagtaatg gg
```

Anaplasma phagocytophilum isolate dog_3743 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KC119573.1

LOCUS KC119573 208 bp DNA linear

DEFINITION Anaplasma phagocytophilum isolate dog_3743 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence.

ACCESSION KC119573 VERSION KC119573.1 GI:440337825

SOURCE Anaplasma phagocytophilum

ORGANISM [Anaplasma phagocytophilum](#)

Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae;
Anaplasma; phagocytophilum group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 208)

AUTHORS Berzina,I., Muller,N., Krudewig,C., Silaghi,C., Matise,I., Ranka,R. Welle,M.
TITLE Persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection associated with skin lesions in seropositive dogs

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 208)

AUTHORS Ranka,R.

JOURNAL Submitted (01-NOV-2012) Latvian Biomedical Research and Study Center, Latvian Biomedical Research and Study Center, Ratsupites Str. 1, Riga LV-1067, Latvia

ORIGIN

1 gggtaaact gtataatccc tgcgggggaa agatttatcg ctattagatg agcctatgtt
61 agattagcta gttgtaggg taaaggccta ccaaggcgat gatctatagc tggctgaga
121 ggatgatcag ccacactgga actgagatac ggtccagact cctacgggag gcagcagtgg
181 ggaatattgg acaatggcgg caagcctg

***Anaplasma phagocytophilum* isolate dog_246 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: KC119574.1

LOCUS KC119574 253 bp DNA linear

DEFINITION *Anaplasma phagocytophilum* isolate dog_246 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION KC119574 VERSION KC119574.1 GI:440337826

SOURCE *Anaplasma phagocytophilum*

ORGANISM [Anaplasma phagocytophilum](#)

Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae; *Anaplasma*; *phagocytophilum* group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 253)

AUTHORS Berzina,I., Muller,N., Krudewig,C., Silaghi,C., Matise,I., Ranka,R. Welle,M.
TITLE Persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection associated with skin lesions in seropositive dogs

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 253)

AUTHORS Ranka,R.

JOURNAL Submitted (01-NOV-2012) Latvian Biomedical Research and Study Center, Latvian Biomedical Research and Study Center, Ratsupites Str. 1, Riga LV-1067, Latvia

ORIGIN

```
1 gcataggaat ctacctagta gtatgggata gccactagaa atgggggta atactgtata
61 atccctgcgg gggaaagatt tatcgctatt agatgagcct atgttagatt agctagtgg
121 tagggtaag gctaccaag gcgatgatct atagctggtc tgagaggatg atcagccaca
181 ctggaaactga gatacgtcc agactctac gggaggcagc agtgggggaat attggacaat
241 gggcgcaagc ctg
```

Anaplasma phagocytophilum isolate dog_246 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KC119574.1

LOCUS KC119574 253 bp DNA linear

DEFINITION *Anaplasma phagocytophilum* isolate dog_246 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION KC119574 VERSION KC119574.1 GI:440337826

SOURCE *Anaplasma phagocytophilum*

ORGANISM [Anaplasma phagocytophilum](#)

Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae; *Anaplasma*; phagocytophilum group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 253)

AUTHORS Berzina,I., Muller,N., Krudewig,C., Silaghi,C., Matise,I., Ranka,R. Welle,M.

TITLE Persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection associated with skin lesions in seropositive dogs

REFERENCE 2 (bases 1 to 253)

AUTHORS Ranka,R.

JOURNAL Submitted (01-NOV-2012) Latvian Biomedical Research and Study Center, Latvian Biomedical Research and Study Center, Ratsupites

Str. 1, Riga LV-1067, Latvia

ORIGIN

1 gcataggaat ctacctagta gtatgggata gccactagaa atggtgggta atactgtata
61 atccctgcgg gggaaagatt tatcgtatt agatgagcct atgftagatt agctagtgg
121 taggtaag gcctaccaag gcgatgatct atagctggtc tgagaggatg atcagccaca
181 ctggaactga gatacgtcc agactctac gggaggcagc agtggggaat attggacaat
241 gggcgcaagc ctg