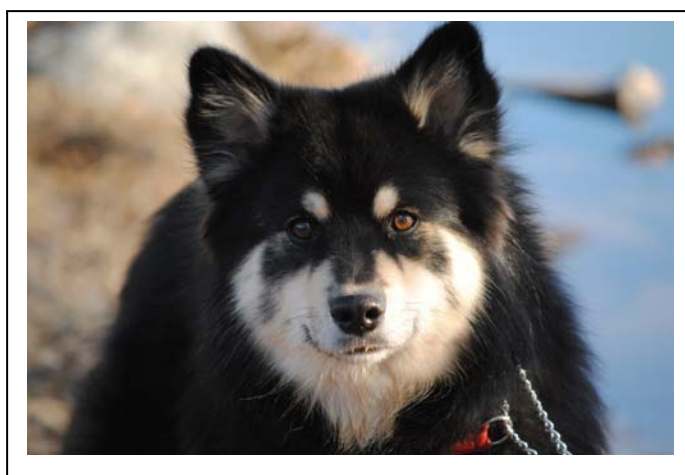




Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Granulocytär anaplasmos hos hund

Elin Liljeroth



Examensarbete, 15 hp

Husdjursvetenskap - kandidatprogram, examensarbete för kandidatexamen

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2013



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Granulocytär anaplasmos hos hund

Granulocytic anaplasmosis in dogs

Elin Liljeroth

Handledare:

Magnus Åbrink, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Caroline Fossum, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program: Husdjursvetenskap

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2013

Omslagsbild: Kimia Maleki

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Anaplasma phagocytophilum, hund, Ixodes ricinus, neutrofil, PCR, serologi

Key words: Anaplasma phagocytophilum, dog, Ixodes ricinus, neutrophil, PCR, serology

Abstract

Granulocytic anaplasmosis is caused by the gram-negative bacterium *Anaplasma phagocytophilum*, which spreads via the tick *Ixodes ricinus*. Migrating from southern latitudes this species of tick has shown a rapid population increase in the north of Sweden, where it was previously non-existing. The migration is probably caused by changes in the climate, as the average temperature in Sweden has increased. *A. phagocytophilum* can cause disease in many pets, but also in humans. The most common clinical symptoms are fever, lack of appetite and lethargy. The bacterium prevents normal function of neutrophils via a range of mechanisms thereby impairing the immune defence of the host. These mechanisms include amongst others; blocking NADPH oxidase, delaying the apoptosis of the neutrophil and exchanging multiple surface antigens. There are several methods of detecting *A. phagocytophilum*, for example through the use of PCR, serological analysis and blood smear examinations. Real-time PCR is considered to be more sensitive and effective than traditional PCR, and is also applied to detect *A. phagocytophilum*, using the genes 16S rRNA and msp2 as targets. The disease caused by this bacterium; Granulocytic anaplasmosis is treated with antibiotics, usually doxycycline or tetracycline. The most common prevention method is a collar named scalibor[®]. This collar secretes a substance which redistributes itself across the skin and the fur of the animal and is deadly to ticks thus preventing transfer of the bacterium.

Sammanfattning

Granulocytär anaplasmos orsakas av den gramnegativa bakterien *Anaplasma phagocytophilum*, som sprids via fästingarten *Ixodes ricinus*. Det har visats att denna fästingart ökat och spridits norrut i Sverige, där den tidigare inte funnits i lika stor utsträckning på grund av ett för kallt klimat. Orsaken till spridningen är troligen klimatförändringar, då Sveriges medeltemperatur stigit under en längre period. Sjukdomen kan drabba många av våra husdjur men även människan. De vanligaste kliniska symptom som kan uppkomma är feber, dålig aptit och slöhet. *A. phagocytophilum* infekterar neutrofiler och har flertalet mekanismer som påverkar neutrofilens funktioner negativt, vilket i sin tur försämrar värdens immunförsvar. Exempel på mekanismerna kan vara blockering av NADPH oxidas, fördröjning av neutrofilens apoptos och utbyte av olika yt-antigen. Det finns olika metoder för att detektera bakterien: PCR, serologi och blodutstryk. Vid PCR används oftast generna 16S rRNA eller msp2 för att detektera *A. phagocytophilum*. Det har även utvecklats realtids-PCR, som används för detektion av denna bakterie, då metoden är både känsligare och mer effektiv. Granulocytär anaplasmos behandlas med antibiotika, vanligtvis doxycycline eller tetracycline. Det vanligaste medlet som finns på marknaden för att förebygga infektion av *A. phagocytophilum* är scalibor[®], ett halsband som utsöndrar ett ämne som sprids över päls och hud, vilket dödar fästingen och förhindrar överföring av bakterien.

Introduktion

Anaplasma phagocytophilum är en bakterie som världen över orsakar sjukdomen granulocytär anaplasmos hos många av våra husdjur. *A. phagocytophilum* hör till familjen *Anaplasmataceae* (Brown, 2012) och är nuförtiden den gemensamma benämning på de tre tidigare arterna *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* och human granulocytär ehrlichios agent (HGE), då dessa anses ha så pass lika egenskaper, både genotypiskt och fenotypiskt (Dumler et al., 2001).

Fästingar, mestadels av släktet *Ixodes*, är vektorer för bakterien och överför den till värdjuret (Pusteria et al., 1999). *Ixodes ricinus* är den art som vanligtvis bär på smittan i Europa (Magnarelli et al., 1995). Andra arter av samma släkte finns runtom i världen som även de bär

på *A. phagocytophilum*; *I. pacificus* och *I. scapularis* i USA och *I. persulcatus* i Asien (Cao et al., 2000) och Ryssland (Carrade et al., 2009).

Det är från så kallade reservoardjur som fästingen infekteras av bakterien. Reservoardjur är oftast vilda djur (Bown et al., 2003), så som rådjur, möss (Walls et al., 1997) och råttor (Carrade et al., 2009). En fästing utvecklas i tre stadier: larv, nymf, och vuxen. För att utvecklas mellan de olika stadierna måste fästingen suga blod från ett djur varvid risken finns att bakterier överförs (Gardiner et al., 1983). När fästingen har blivit infekterad av bakterien och sedan biter sig fast på ett nytt djur, dröjer det ungefär 24-48 timmar innan bakterien överförs till det nya djuret (Katavolos et al., 1998), där den sprids via lymfan eller blodet (Kohn et al., 2008) för att sedan infektera neutrofiler (Popov et al., 1998).

De djurslag som vanligtvis blir infekterade av *A. phagocytophilum* är hästar (Barlough et al., 1995), katter (Tarello, 2005), hundar (Egenvall et al., 1997) och idisslare (Rikihiya, 1991). Även människor kan infekteras (Dumler et al., 2001). De kliniska symptom som kan uppkomma vid anaplasmainfektion är feber, slöhet, dålig aptit och i vissa fall neurologiska problem. Vid analys av blodprov kan även anemi, trombocytopeni (brist på blodplättar) och lymfopeni (brist på vita blodkroppar) upptäckas (Jensen et al., 2007).

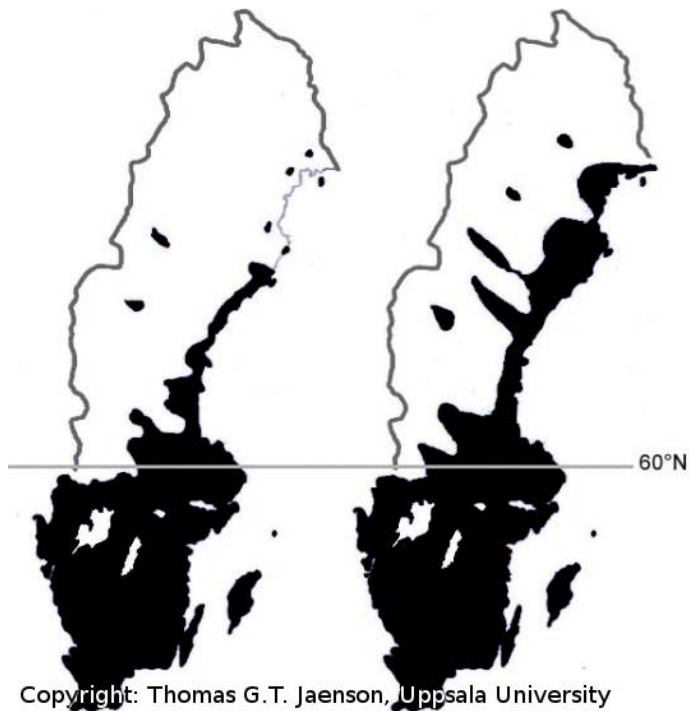
Syftet med denna litteraturstudie är att ta reda på hur infektionsprocessen går till, hur de olika detektionsmetoderna fungerar och om de kan utvecklas. Detta är viktigt för att i ett så tidigt stadium som möjligt kunna upptäcka sjukdomen hos våra husdjur, och därmed sätta in en korrekt behandling. För att ta reda på detta besvaras frågorna:

- Hur ser spridningen av *Ixodes ricinus* ut i Sverige?
- Hur infekterar bakterien värden?
- Hur fungerar de olika detektionsmetoderna, och vilken är mest effektiv?
- Hur kan anaplasmainfektion förebyggas och finns det några miljöaspekter att ta hänsyn till i frågan?

Granulocytär anaplasmos

Fästingen i Sverige

Under de senaste 20 åren har antalet fästingar av arten *I. ricinus* ökat i Sverige (Jaenson et al., 2012). Detta tros bero på två faktorer: klimatförändringar och en ökning av rådjurspopulationen (Lindgren et al., 2000). Anledningen till ökningen av rådjurspopulationen var att många av dess predatorer drabbades av skabb under 90-talet. Klimatförändringarna resulterar i mildare vintrar, då bland annat Sveriges medeltemperatur ökat med 2°C (Jaenson et al., 2012). En undersökning av Jaenson et al. (2012) visade att flest fästingar av arten *I. ricinus* fanns, i början av 1990-talet, i mellersta och södra Sverige. *I. ricinus* har inte funnits i något större antal i norra Sverige, men under perioden 1990-2008 visades antalet ha ökat med drygt 60 % i norra Sverige.



Copyright: Thomas G.T. Jaenson, Uppsala University

Figur 1: Spridningen av *I. ricinus* i Sverige under 1990-talet (vänster) och 2008 (höger). Jaenson et al. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. Parasites & Vectors January 2012.

Neutrofilens roll i försvaret mot patogener

Neutrofiler försvarar kroppen mot patogener främst genom fagocytos och intracellulär destruktion. Patogenen binder först till receptorer på neutrofilens yta. Därefter sker fagocytos av patogenen. När patogenen väl är inne i neutrofilen, sammansmälter lysosomer med fagosomen vilket aktiverar nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidas (NADPH oxidas) som i sin tur genererar syreradikaler, som dödar patogenen (Carrade et al., 2009). Om ingen fagocytos sker stimuleras inte neutrofilerna vilket gör att även NADPH oxidas förblir inaktivt. NADPH oxidas består av olika så kallade phox-proteiner som binder till flavocytochrom b558, som i inaktiv form antingen finns på neutrofilens cellmembran, eller på sekretoriska vesiklars membran. När NADPH oxidas aktiveras binder dessa vesiklar till fagosomens membran, och överför flavocytochrom b558 vilket gör att syreradikalerna bildas (Ijdo et al., 2004). Därefter genomgår neutrofilen celldöd genom apoptos (Carrade et al., 2009).

Infektionsförloppet av *A. phagocytophilum*

A. phagocytophilum är en gramnegativ bakterie som lever intracellulärt (Raoult et al., 1997). Vid infektion binder bakterien till ligander på ytan av neutrofiler, såsom P-selektin glykoprotein ligand-1 (PSGL-1) (Herron et al., 2000), för att sedan ta sig in i neutrofilen genom caveolae-medierad endocytos (Rikihisa et al., 2003). Caveolae är en del av "lipid rafts" som är områden på cellmembranet där många receptorer samlats för att reglera cellsignaleringen (Insel et al., 2005). Caveolae är inbuktningar i cellmembranet (Yamada, 1955), som patogener kan använda som ingång och samtidigt undvika fagocytos. Caveolae består av kolesterol, glykosfingolipider och lipid-förankrade molekyler (Anderson, 1998) och innehåller även flertalet signaleringsmolekyler (Duncan et al., 2002).

När bakterien replikerar och ska föröka sig bildas mikrokolonier, inklusionskroppar eller så kallade morulae, inuti vesiklar som bildats vid endocytosen (Carrade et al., 2009). *A.*

phagocytophilum har ett flertal mekanismer som förbättrar dess förutsättningar att överleva inuti neutrofilen. Den blockerar bland annat NADPH oxidas vilket gör att produktionen av syreradikaler upphör, vilka normalt sett produceras för att döda bakterien (Rikihisa et al., 2000). Blockeringen fungerar genom att bakterien försämrar neutrofilens reglering av specifika försvarsgener, bland annat genen gp91^{phox}, med hjälp av det bakteriella proteinet AnkA som utför aktionen efter migration till cellkärnan (Garcia-Garcia et al., 2009). Det är fortfarande oklart hur AnkA fungerar i cellkärnan men enligt (Park et al., 2004) tros proteinet binda till neutrofilens DNA. Sedan kan AnkA också binda till Src homology phosphatase-1 (SHP-1) (Scharf et al., 2011). AnkA blir tyrosinfosforylerat när det tagit sig in i cellen, vilket gör bindningen till SHP-1 möjlig (Ijdo et al., 2007). SHP-1 finns bland annat för att defosforylera tyrosin (Klingmüller et al., 1995), vilket är nödvändigt för att cell-cell signaleringen ska vara så känslig som möjligt och därav fungera korrekt (Neel et al., 1997). När AnkA binder till SHP-1 kan cellens signalering störas (Scharf et al., 2011).

En neutrofil genomgår apoptos efter ungefär 12 timmar vilket ytterligare minskar möjligheten för att en patogen ska överleva (Akgul et al., 2001). Även denna del av försvaret kan *A. phagocytophilum* påverka till sin fördel genom att fördröja apoptosen och förlänga neutrofilens livslängd. Genom att neutrofilen överlever en längre tid får även bakterien en längre tid att bilda fler inklusionskroppar, och därmed fortsätta sin tillväxt (Rikihisa, 2006).

A. phagocytophilum har cirka 100 varianter av ett så kallat ”major surface protein 2” (msp2), ett antigen som finns på ytan av bakterien (Barbet et al., 2006). Detta gör att bakterien kan byta ut sitt antigen när det blivit igenkänt av antikroppar för att fortsätta undkomma världens immunförsvar. Detta antigenutbyte kan liknas vid en mutation (Rejmanek et al., 2012).

Påverkan på hund

Vid infektion av *A. phagocytophilum* är det en stor del av alla hundar som inte utvecklar kliniska symptom (Carrade et al., 2009). Inkubationstiden är cirka 1-2 veckor (Egenvall et al., 1998), och därefter har många av de infekterade hundarna visat slöhet (Greig et al., 1996). Några dödsfall har hittills inte rapporterats (Carrade et al., 2009).

Det är ovanligt att hundar smittade med *A. phagocytophilum* drabbas av neurologiska problem. I de fall som detta har inträffat har hundarna antingen drabbats av kramper eller nedsatt förmåga att kontrollera kroppen. Det kan vara svårt att avgöra om dessa neurologiska problem verkligen uppstår på grund av *A. phagocytophilum*, då flera av hundarna i dessa fall haft tidigare neurologiska problem, som exempelvis epilepsi (Greig et al., 1996).

Det är fortfarande oklart om hundar kan drabbas av kronisk granulocytär anaplasmos, då infektionen kan självläka efter en tid (Dumler et al., 2007a). Det finns dock studier som visat positiva PCR resultat, trombocytopeni och inklusionskroppar i blodutstryk även efter behandling med antibiotika (Carrade et al., 2009).

Detektionsmetoder

Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR) är en teknik som används för att kopiera upp stora mängder av specifika DNA-fragment. Tekniken sker i tre steg som i sin tur upprepas i flertalet cykler. Det första steget går ut på att värma upp DNA-strängarna i provet till en viss temperatur, där de delar på sig och blir enkelsträngade. I det andra steget används så kallade primers, oligonukleotider, som är komplementära till specifika sekvenser i bakteriens DNA och kan binda till de motsatta DNA-strängarna. I det tredje och sista steget används enzymet DNA-

polymeras, för att bygga ihop och förlänga de komplementära DNA-strängarna (Willey et al., 2009b). När DNA utvunnits genom PCR-reaktionen används ofta gelelektrofores för att konfirmera att DNA med förväntad storlek producerats. Gelplattan har en negativ ände, där DNA-molekylerna placeras i brunnar, och en positiv ände. DNA-molekylerna vandrar från den negativa änden till den positiva änden med hjälp av ett elektriskt fält. De mindre och kortare molekylerna kan lättare ta sig fram i gelen medan de större och längre molekylerna har svårare att ta sig fram. De olika storlekarna på DNA-fragmenten kan sedan jämföras med standardprov som körs parallellt på gelen för att bestämma ursprung hos provets DNA (Willey et al., 2009d).

Nackdelar med (konventionell) PCR kan vara att det lätt blir falska negativa resultat på grund av att reaktionen på något sätt har gått fel. Det finns även en risk för falska positiva resultat då det är lätt att produkten blir kontaminerad (Edwards et al., 1994).

16S rRNA är ribosomala gener som finns hos flertalet bakterier (Amann et al., 1990) och används vid PCR för att detektera *A. phagocytophilum* (Bell et al., 2005). Msp2 är mer specifik för *A. phagocytophilum* än vad 16S rRNA är, och kan därför med fördel användas vid detektion genom PCR (Scorpio et al., 2004). Det finns även studier gjorda där Anka använts för att detektera *A. phagocytophilum* genom PCR (Beall et al., 2008).

För att få en ännu känsligare metod och ett mer specifikt resultat har Realtids-PCR utvecklats, för detektion av *A. phagocytophilum* (Courtney et al., 2006). Skillnaden på konventionell PCR och Realtids-PCR är att vid Realtids-PCR tillsätts en fluorescerande probe som gör detektion i realtid möjlig genom att mängden PCR-produkter mäts direkt i provröret (Willey et al., 2009b). Två primrar används, som i den konventionella PCR-metoden, men även en probe (ofta en Taqman-probe) tillsätts dit fluorescerande molekyler bundits (Pusterla et al., 1999). Vid detektion av *A. phagocytophilum* har olika prober specifika för msp2-genen, utvecklats (Courtney et al., 2006). En probe är uppbyggd som en primer, bestående av en oligonukleotid med en 5'- och en 3' ände (Schmittgen et al., 2000). Skillnaden är att en probe vid 5' änden har en så kallad fluorofor, en "reporter", och vid 3' änden en quencher (Abrahamian et al., 2013). Quencher-molekylen finns där för att förhindra att "reportern" fluorescerar. Efter bindning av probe och primer till den specifika DNA-sekvensen, klyver ett Taq-polymeras "reportern" från proben, vilket leder till att quencher inte längre förhindrar fluoresceringen så detektion av en fluorescerande signal, från "reportern", kan ske (Smith et al., 2008).

Serologiska analyser

Vid serologisk analys påvisas antikroppar som har bildats mot bakterieantigenet. Det finns olika slags serologiska test som kan göras, bland annat "indirect fluorescent-antibody test" (IFA-test) (Dawson et al., 1991) och "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA). Det finns två sorters ELISA där den så kallade "indirect immunosorbent assay" används för att upptäcka antikroppar. En mikrotiter-platta används där antigen bundits till väggarna i varje brunn. Ett testserum tillsätts och om det finns specifika antikroppar binder de till antigenet. De antikroppar som inte bundit sköljs sedan bort. Därefter tillsätts antikroppar märkta med ett enzym som binder till de redan bundna antikropparna. Det sista steget innebär tillsats av ett enzymsubstrat med ett kromogen som gör att produkten blir färgad (Willey et al., 2009a).

IFA-test fungerar på liknande sätt som ELISA. Skillnaden är att vid ett IFA-test tillsätts såsmåningom antikroppar märkta med fluorescein, vilka reagerar med antikropp-antigen komplexet (som tidigare fixerats på ett objektglas), vilket i sin tur gör att antikropparna går att upptäcka med hjälp av ett fluorescence mikroskop (Willey et al., 2009c).

Antikroppar är glykoproteiner och kallas även immunoglobuliner. Dessa delas in i fem klasser; IgG, IgM, IgA, IgD och IgE varav IgM är det primära antikroppssvaret (Edelman, 1973). Antikroppar produceras av B-celler och tillhör det adaptiva immunförsvaret. På ytan av B-celler finns receptorer som är specifika för särskilda antigen. B-celler differentierar till plasmaceller och minnesceller vid bindning till antigen och med hjälp från T-celler (Willey et al., 2009f). När samma antigen kommer in i kroppen en andra gång, känner minnesceller igen dessa och kan ge ett mycket snabbare svar (Willey et al., 2009e).

Vid en anaplasmainfektion detekteras immunoglobulin G (IgG) genom serologisk analys. Denna klass av antikroppar bildas inte förrän senare i infektionsstadiet, vilket gör att serologisk analys inte är optimal vid initieringen av infektionen. Antikroppar som bildats mot bakterieantigenet kan också finnas kvar månader efter infektionstillfället, även om bakterien i sig inte längre lever kvar i hunden (Carrade et al., 2009).

Serologisk analys kan även vara svårt då antikroppar mot flera närbesläktade arter kan korsreagera (Rosenfeld-Aguero et al., 2002). Korsreaktioner mellan antikroppar tillhörande *A. phagocytophilum* och *A. platys* eller *A. marginale* kan till exempel ske, vilket betyder att ett positivt resultat för *A. phagocytophilum* också kan innebära en infektion av *A. platys*. Det kan därför vara nödvändigt att använda flera detektionsmetoder, exempelvis PCR, för att säkerställa ett resultat (Carrade et al., 2009)

Blodutstryk

Blodutstryk kan göras och undersökas i mikroskop för att upptäcka inklusionskroppar i neutrofiler (Greig et al., 1996). Detta är ingen specifik metod och kan inte påvisa om det är just *A. phagocytophilum* som infekterat djuret. För att ta reda på vilken art det handlar om bör därför PCR eller serologisk analys utföras (Kohn et al., 2008).

Blodutstryk är den metod som alltid går snabbast att utföra, men den största fördelen med denna metod är att den går att utföra tidigt i infektionsstadiet, tidigare än både serologisk analys och PCR (Dumler et al., 2007b).

Behandling

Behandling av granulocytär anaplasmos sker med hjälp av antibiotika. Doxycyklin är ett antibiotikum som används och fungerar genom att inhibera proteinsyntesen i bakterien. Doxycyklin är effektiv då det har hög fettlöslighet, vilket gör att det lättare kan absorberas från tarmen. Doxycyklin har en lång halveringstid i serum tack vare att det absorberas så pass lätt och genom en långsam utsöndring (Rikihiya et al., 1994). Redan efter 24-48 timmar med behandling av doxycycline visar de flesta hundar en klar förbättring av de kliniska symptomen (Poitout et al., 2005).

Tetracyklin är ett annat antibiotikum som kan användas som behandling vid granulocytär anaplasmos (Poitout et al., 2005). Denna fungerar också genom att inhibera bakteriens proteinsyntes men genom att förhindra att aminoacyl-tRNA interagerar med bindningsställe A på ribosomen (Chopra et al., 2001). Aminoacyl-tRNA behövs vid proteinsyntesen för att de korrekta och passande aminosyrorna ska kunna levereras till ribosomerna (Ibba et al., 2000).

Förebyggande metoder

Scalibor®

Scalibor® är ett halsband som fästs runt hundens hals för att förebygga infektion från fästingbett. Det aktiva ämnet är deltametrin (DTM) som långsamt sprids över hundens hud

och päls. Ämnet verkar genom att hålla fästingnervernas natriumkanaler öppna vilket i sin tur leder till att fästingen dör (van Den Bos et al., 2002). I en studie av van Den Bos et al. (2002) visades att antalet fästingar av arten *I. ricinus* minskade med närmare 80 % hos hundar med halsband.

Halsband innehållande DTM bibehåller sin effekt i närmare 8 månader vilket täcker perioden då fästingar är som mest aktiva (Maroli et al., 2001). DTM kan dock ha påverkan på vattenlevande djur då det i laboratorieförsök har påvisat hög toxicitet hos fisk. Ämnet ska inte vara toxiskt för däggdjur, som exempelvis hunden (kemikalieinspektionen, 1997).

Diskussion

Den globala uppvärmningen tror jag är den främsta anledningen till att fästingar ökat, och kommer fortsätta öka, i antal. Vintrarna blir varmare vilket underlättar för fästingar, eller djur i allmänhet, att överleva bättre. I och med att antalet fästingar ökar, ökar också risken att fästingar infekterade med *A. phagocytophilum* blir fler vilket i sin tur leder till fler sjukdomsfall hos våra husdjur. Det här är något som är svårt för människan att förhindra och därför är det viktigt att utveckla framförallt de förebyggande metoderna, men också detektionsmetoderna.

Studier har visat att infektion av *A. phagocytophilum* såsmåningom självläker, och det har inte kunnat påvisas att infektionen skulle kunna bli kronisk. Det behövs mer forskning kring detta då det i dagsläget antagligen är svårt att säga om infektionen blossat upp igen, eller om djuret infekterats av en ny bakterie, det vill säga om djuret insjuknat med liknande symptom en andra gång. Andra studier har dock kunnat visa exempelvis positiva PCR-resultat eller trombocytopeni, även efter en korrekt och tillräcklig antibiotikabehandling. Trombocytopeni borde kunna bero på andra orsaker men ett positivt PCR-resultat betyder att bakterier återigen har kunnat detekteras i blodet, vilket är svårt att ta fel på. Detta positiva PCR-resultat skulle nödvändigtvis inte behöva betyda att det återigen är detektion av just *A. phagocytophilum* som skett om exempelvis genen 16S rRNA använts, eftersom denna gen finns hos flertalet bakterier och PCR reaktionen eventuellt skulle kunna ge en falsk positiv reaktion.

Problemet med 16S rRNA är att dessa inte bara finns hos *A. phagocytophilum*, utan även hos andra arter, vilket kan göra det svårt att veta vilken art som detekterats. Här skulle kanske *msp2* vara bättre, då den är mer specifik för *A. phagocytophilum*.

En fördel med Realtids-PCR är att gelelektrofores inte behöver utföras, som i konventionell PCR, eftersom hela processen sker i ett och samma provrör. Detta borde kunna spara både tid och arbete, och möjligtvis en minskad materialkostnad. Det finns alltid en risk för kontamination i PCR-processen, vilket då skulle kunna påverka resultaten. PCR har dock en fördel över övriga detektionsmetoder på grund av bättre känslighet och därmed säkrare resultat.

Den minst känsliga detektionsmetod som används idag för *A. phagocytophilum* är blodutstryk, men det är samtidigt den metod som snabbast går att utföra efter infektionstillfället. Då detta antagligen är den enklaste metod att utföra skulle jag tro att det bästa är att använda denna, alternativt serologisk analys, till en början om ett djur kommer in med kliniska symptom. Om inklusionskroppar eller en större mängd antikroppar är möjligt att detektera går det till en viss del att säkerställa infektion av *A. phagocytophilum*, dock tycker jag att PCR även bör utföras för att kunna få ett säkert resultat och därmed undvika antibiotikabehandling i onödan. Genom att använda sig av fler detektionsmetoder och i just denna ordning tror jag det underlättar arbetsbördan och även den ekonomiska frågan. PCR kan vara både dyrt och tidskrävande och

om denna metod skulle utföras först för att sedan visa att detektion av bakterier inte var möjlig, har den mer eller mindre använts i onödan. Istället kan då blodutstryk eller serologisk analys först visa om risk för bakterieinfektion finns.

Om endast serologisk analys utförs och en större mängd antikroppar detekteras och det samtidigt finns kliniska symptom, ges ofta antibiotika. Även om djuret tillfrisknat kan antikroppar finnas kvar i kroppen, vilket betyder att en serologisk analys då skulle ge ett positivt resultat, vilket i sin tur kan leda till en antibiotikabehandling även om djuret inte är sjukt. I och med detta bör hänsyn tas till risken för ökad utveckling av antibiotikaresistens.

Då IgM är den antikropp som först bildas vid infektion går det att fundera över varför inte denna antikropp detekteras, hellre än IgG. Det skulle då vara möjligt att få ett resultat ännu tidigare, och därigenom kunna sätta in behandling i ett tidigare stadium av infektionen. Eftersom de kliniska symptomen dock inte uppkommer förrän 1-2 veckor efter infektionstillfället, undersöks inte djuren tidigare än så. Efter så pass många dagar har antagligen IgG hunnit bildas, och då kan dessa detekteras. Genom att B-celler även differentierar till minnesceller blir immunsvaret mycket snabbare när antigen från bakterien återigen försöker infektera neutrofilerna, vilket gör att koncentrationen av IgG ökar snabbt.

En av mekanismerna bakterien har för att undvika värdens immunförsvar är bindning till SHP-1. SHP-1 måste vara aktivt för att signaleringen mellan celler ska fungera korrekt, och när Anka går in och binder till proteinet, borde det i sin tur störa signaleringen vilket då skulle gynna *A. phagocytophilum*. Det bakteriella proteinet Anka har alltså två funktioner som den utför när den utsöndrats in i cellen; störning av signaleringen så fagocytosen antagligen fungerar ännu sämre, och bindning till DNA inne i neutrofilens cellkärna så dess genreglering försämras – allt för att miljön i neutrofilen ska bli så optimal som möjligt för bakterien.

DTM är det aktiva ämnet i en av de vanligare förebyggande metoderna, scalibor-halsband. Ämnet är inget som ska påverka hunden negativt, men det kan påverka miljön hunden vistas i. Exempelvis bör inte hunden badas i sjöar då DTM kan spridas i vattnet och ha negativa effekter för vissa vattenlevande djur. Jag anser även att effekten på hunden borde bli sämre om den badar under perioden då halsbandet används. DTM finns som tidigare sagt på hundens päls och hud, vilket gör att detta enkelt skulle kunna tvättas bort.

Eftersom det tar närmare ett dygn för bakterien att överföras från fästing till värddjur, bör fästingen avlägsnas så tidigt som möjligt. Ju tidigare borttagande sker, desto lägre blir risken att bakterien hinner överföras.

Slutsats

De detektionsmetoder som idag används för att påvisa *A. phagocytophilum* är PCR, serologi och blodutstryk. PCR detekterar bakterier i blodet, serologiska analyser påvisar antikroppar bildade mot antigen och blodutstryk detekterar inklusionskroppar i neutrofiler, i blodet. Den mest effektiva metod för detektion av *A. phagocytophilum* är inte en enskild metod i sig, utan en kombination av de två eller tre nämnda metoderna. PCR är den mest känsliga och därmed den säkraste metoden, men den är samtidigt mer kostsam och är därför inte alltid den mest optimala metod att börja med när ett djur kommer in med kliniska symptom. Därför kan PCR kombineras med antingen serologi eller blodutstryk då någon av dessa metoder först kan ge ett svar om djuret är infekterat av något slag, och därmed konfirmeras av PCR genom att bakteriearten detekteras.

Referenser

- Abrahamian, P.E., Abou-Jawdah, Y. Detection and quantitation of the new world Squash leaf curl virus by TaqMan real-time PCR. *J. Virol. Methods* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.001>
- Akgul, C., Moulding, D.A., Edwards, S.W. 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *Federation of European Biochemical Societies* 487, 318-322.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology* 56, 1919-1925.
- Anderson, R.G.W. 1998. The caveolae membrane system. *Annual review of biochemistry* 67, 199-225.
- Barbet, A.F., Lundgren, A.M., Alleman, A.R., Stuen, S., Bjöersdorff, A., Brown, R.N., Drazenovich, N.L., Foley, J.E. 2006. Structure of the expression site reveals global diversity in MSP2 (P44) variants in *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and immunity* 74, 6429-6437.
- Barlough, J.E., Madigan, J.E., Derock, E., Dumler, J.S., Bakken, J.S. 1995. Protection against *Ehrlichia equi* Is Conferred by Prior Infection with the Human Granulocytotropic Ehrlichia (HGE agent). *Journal of Clinical Microbiology* 33, 3333-3334.
- Beall, M.J., Chandrashekar, R., Eberts, M.D., Cyr, K.E., Diniz, P.P.V.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 and zoonotic diseases* 8, 455-464.
- Bell, C.A., Patel, R. 2005. A real-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii*. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 53, 301-306.
- Bown, K.J., Begon, M., Bennett, M., Woldehiwet, Z., Ogden, N.H. 2003. Seasonal Dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a Rodent-Tick (*Ixodes trianguliceps*) System, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases* 9, 63-70.
- Brown, W.C. 2012. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35, 241-252.
- Cao, W-C., Zhao, Q-M., Zhang, P-H., Dumler, J.S., Zhang, X-T., Fang, L-Q., Yang, H. 2000. Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* Ticks from an Area in China Where Lyme Disease Is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4208-4210.
- Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L., Sykes, J.E. 2009. Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 1129-1141.
- Chopra, I., Roberts, M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews* 65, 232-260.
- Courtney, J.W., Massung R.F. 2006. Multiplex Taqman PCR assay for rapid detection of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi*. *Annals of the New York academy of sciences* 990, 369-370.

- Dawson, J.E., Anderson, B.E., Fishbein, D.B., Sanchez, J.L., Goldsmith, C.S., Wilson, K.H., Duntley, C.W. 1991. Isolation and characterization of an Ehrlichia sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 2741-2745.
- Dumler, J.S., Barat, N.C., Barat, C.E., Bakken, J.S. 2007a. Human granulocytic anaplasmosis and macrophage activation. *Clinical infectious diseases* 45, 199-204.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, 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 Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 2145-2165.
- Dumler, J.S., Madigan, J.E., Pusterla, N., Bakken, J.S. 2007b. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clinical infectious diseases* 45, 45-51.
- Duncan, M.J., Shin, J-S., Abraham, S.N. 2002. Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cellular Microbiology* 4, 783-791.
- Edelman, G.M. 1973. Antibody structure and molecular immunology. 180: 830-840.
- Edwards, M.C., Gibbs, R.A. 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome research* 3, 65-75.
- Egenvall, A., Bjöersdorff, A., Lilliehöök, I., Engvall-Olsson, E., Karlstam, E., Artursson, K., Hedhammar, Å., Gunnarsson, A. 1998. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *Veterinary Record* 143, 412-417.
- Egenvall, A.E., Hedhammar, Å.A., Bjöersdorff, A.I. 1997. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Veterinary Record* 140, 222-226.
- Garcia-Garcia, J.C., Rennoll-Bankert, K.E., Pelly, S., Milstone, A.M., Dumler, J.S. 2009. Silencing of Host Cell CYBB Gene Expression by the Nuclear Effector AnkA of the Intracellular Pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity* 77, 2385-2391.
- Gardiner, W.P., Gettinby, G. 1983. A weather-based prediction model for the life-cycle of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. *Veterinary Parasitology* 13, 77-84.
- Greig, B., Asanovich, K.M., Armstrong, P.J., Dumler, J.S. 1996. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 44-48.
- Herron, M.J., Nelson, C.M., Larson, J., Snapp, K.R., Kansas, G.S., Goodman, J.L. 2000. Intracellular Parasitism by the Human Granulocytic Ehrlichiosis Bacterium Through the P-Selectin Ligand, PSGL-1. *Science* 288, 1653-1656.
- Ibba, M., Söll, D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annual review of biochemistry* 69, 617-650.
- Ijdo, J.W., Carlson, A.C., Kennedy, E.L. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA is tyrosine-phosphorylated at EPIYA motifs and recruits SHP-1 during early infection. *Cellular Microbiology* 9, 1284-1296.
- Ijdo, J.W., Mueller, A.C. 2004. Neutrophil NADPH Oxidase Is Reduced at the *Anaplasma phagocytophilum* Phagosome. *Infection and Immunity* 72, 5392-5401.

- Insel, P.A., Head, B.P., Ostrom, R.S., Patel, H.H., Swaney, J.S., Tang, C-M., Roth, D.M. 2005. Caveolae and lipid rafts: G protein-coupled receptor signaling microdomains in cardiac myocytes. *Annals of the New York academy of sciences* 1047, 166-172.
- Jaenson, T.G.T., Jaenson, D.G.E., Eisen, L., Petersson, E., Lindgren, E. 2012. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasites & Vectors* 5.
- Jensen, J., Simon, D., Escobar, H.M., Soller, J.T., Bullerdiel, J., Beelitz, P., Pfister, P., Nolte, I. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in Dogs in Germany. *Zoonoses and Public Health* 54, 94-101.
- Katavolos, P., Armstrong, P.M., Dawson, J.E., Telford S.R III. 1998. Duration of Tick Attachment Required for Transmission of Granulocytic Ehrlichiosis. *The journal of infectious diseases* 177, 1422-1425.
- Kemikalieinspektionen. November 1997. <http://apps.kemi.se/bkmregoff/bkmblad/Deltamet.pdf>
- Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley L.C., Neel, B.G., Lodish, H.F. 1995. Specific recruitment of SH-PTP1 to the Erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell press* 80, 729-738.
- 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* 22, 1289-1295.
- Lindgren, E., Tälleklint, L., Polfeldt, T. 2000. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Health Perspectives* 108, 119-123.
- Magnarelli, L.A., Stafford K.C.III., Mather, T.N., Yeh, M-T., Horn, K.D., Dumler, J.S. 1995. Hemocytic Rickettsia-Like Organisms in Ticks: Serologic Reactivity with Antisera to Ehrlichiae and Detection of DNA of Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2710-2714.
- Maroli, M., Mizzoni, V., Siragusa, C., D'orazi, A., Gradoni, L. 2001. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and veterinary entomology* 15, 358-363.
- Neel, B.G., Tonks, N.K. 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Cell opinion in cell biology* 9, 193-204.
- Park, J., Kim, K.J., Choi, K-S., Grab, D.J., Dumler, S. 2004. *Anaplasma phagocytophilum* AnkA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins. *Cellular microbiology* 6, 743-751.
- 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* 43, 796-801.
- Popov, V.L., Han, V.C., Chen, S-M., Dumler, J.S., Feng, H-M., Andreadis, T.G., Tesh, R.B., Walker, D.H. 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *Journal of Medical Microbiology* 47, 235-251.
- Pusteria, N., Leutenegger, C.M., Huder, J.B., Weber, R., Braun, U., Lutz, H. 1999. Evidence of the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in *Ixodes ricinus* Ticks in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1332-1334.
- Pusterla, N., Huder, J.B., Leutenegger, C.M., Braun, U., Madigan, J.E., Lutz, H. 1999. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophilum* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of clinical microbiology* 37, 1329-1331.

- Raoult, D., Roux, V. 1997. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 694-719.
- Rejmanek, D., Foley, P., Barbet, A., Foley, J. 2012. Evolution of antigen variation in the tick-borne pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Molecular biology and evolution* 29, 391-400.
- Rikihisa, Y. 1991. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 286-308.
- Rikihisa, Y. 2006. *Ehrlichia* subversion of host innate responses. *Current Opinion in Microbiology* 9, 95-101.
- Rikihisa, Y., Iqbal, Z. 1994. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *Journal of Clinical Microbiology* 7, 1644-1649.
- Rikihisa, Y., Lin, M. 2003. Obligatory intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycosylphosphatidylinositol-anchored preteins. *Cellular Microbiology* 5, 809-820.
- Rikihisa, Y., Mott, J. 2000. Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent Inhibits Superoxide Anion Generation by Human Neutrophils. *Infection and Immunity* 68, 6697-6703.
- Rosenfeld-Aguero, M.E., Donnarumma, L., Zentmaier, L., Jacob, J., Frey, M., Noto, R., Carbonaro, C.A., Wormser, G.P. 2002. Seroprevalence of Antibodies that react with *Anaplasma phagocytophila*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, in different populations Westchester county, New York. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2612-2615.
- Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Petrovec, M., Kiener-Schaarschmidt, D., Liebisch, G., Runge, M., Ganter, M., Kehl, A., Dumler, S., Garcia-Perez, A.L., Jensen, J., Fingerle, V., Meli, M.L., Ensser, A., Stuen, S., von Loewenich, F.D. 2011. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* Anka gene clusters. *Journal of clinical microbiology* 49, 790-796.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J., Reed, M.W. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical biochemistry* 285, 194-204.
- Scorpio, D.G., Caspersen, K., Ogata, H., Park, J., Dumler, J.S. 2004. Restricted changes in major surface protein-2 (msp2) transcription after prolonged in vitro passage of *Anaplasma phagocytophilum*. *BMC microbiology* 4, doi:10.1186/1471-2180-4-1.
- Smith, C.J., Osborn, A.M. 2008. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology* 67, 6-20.
- Tarello, W. 2005. Microscopic and clinical evidence for *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* infection in Italian cats. *Veterinary Record* 156, 772-774.
- van Den Bos, R.H.C., Curtis, R.J. 2002. The use of a 4 % (w/w) deltamethrin collar (Scalibor® ProtectorBand) in the extended control of ticks on dogs. *Experimental and Applied Acarology* 28, 297-303.
- Walls, J.J., Greig, B., Neitzel, D.F., Dumler, J.S. 1997. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 853-855.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2009a. *Clinical Microbiology and Immunology. I: Prescott's Principles of Microbiology*, 780-782. McGraw-Hill Higher Education.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2009b. *Biotechnology and Industrial Microbiology. I: Prescott's Principles of Microbiology*, 357-358. McGraw-Hill Higher Education.

- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2009c. Clinical Microbiology and Immunology. I: Prescott's Principles of Microbiology, 771. McGraw-Hill Higher Education.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2009d. Biotechnology and Industrial Microbiology. I: Prescott's Principles of Microbiology, 357-359. McGraw-Hill Higher Education.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2009e. Nonspecific (innate) host resistance. I: Prescott's Principles of Microbiology, 667. McGraw-Hill Higher Education.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2009f. Specific (adaptive) immunity. I: Prescott's Principles of Microbiology, 701-702. McGraw-Hill Higher Education.
- Yamada, E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. The Journal of cell biology 1, 445.