

Т Р А К И Й С К И У Н И В Е Р С И Т Е Т

ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра „Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести”

Красимира Желязкова Господинова

**ДИАГНОСТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ
ЕРЛИХИОЗА И АНАПЛАЗМОЗА ПО КУЧЕТА
В БЪЛГАРИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация за присъждане на образователна и научна
степен „ДОКТОР”**

Научна специалност: Епизоотология, инфекциозни болести и профилактика на
заразните заболявания при животните

Научни ръководители:

Доц. д-р Владимир Петров

Проф. д-р Илия Цачев, двмн

СТАРА ЗАГОРА

2024

Дисертационният труд е написан на 156 страници, Представените резултати са онагледени с 12 фигури и 24 таблици. В библиографията са включени 292 литературни източника, от които 15 са на български автори и 277 на чужди автори.

Дисертационният труд беше обсъден на 15.01.2024 г. от Разширен катедрен съвет, определен със заповед № 80/15.12.2023 г. на Декана на ВМФ, Тракийски Университет и е насочен за защита пред научно жури.

Разработването на дисертационния труд е извършено в катедра “Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести” и катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“, Медицински факултет, Тракийски университет

Издавам сърдечна благодарност на:

- *Научните ми ръководители доц. Владимир Петров и проф. Илия Цачев за непрекъснатата подкрепа, опора и напътствия през всичките етапи на работния процес;*
- *Проф. д-р Спаска Станилова и доц. д-р Люба Митева от катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“, за безрезервната помощ и съдействие*
- *проф. Хандан Четинкая от катедрата по паразитология към Ветеринарномедицинския факултет на Истанбулския университет, Турция*
- *Всички колеги от катедра “Ветеринарна микробиология, инфекциозни и паразитни болести”*
- *На моето семейство за огромната подкрепа, разбиране и търпение*

Защитата на дисертационния труд ще се състои наот
..... Ч. В
ВМФ, при Тракийски Университет, Стара Загора. Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в отдел „Научен“ на факултета и на интернет страницата на Университета: www.uni-sz.bg

СЪДЪРЖАНИЕ	Страница
ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА.....	4
УВОД.....	5
I. СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ.....	8
1. Цел и задачи.....	8
2. Материал и методи.....	9
2.1. Животни и проби.....	9
2.2. Хематологични и биохимични изследвания.....	9
2.3. Серологични изследвания.....	10
2.4. Молекулярно-генетични изследвания.....	12
2.5. Статистически методи за обработка на данните.....	18
II. РЕЗУЛТАТИ.....	19
1. Клинични признаци.....	19
2. Хематологични изследвания.....	20
3. Биохимични изследвания.....	20
4. Серологични изследвания.....	23
5. PCR изследвания.....	27
6. Съпоставяне на резултати	31
III. ОБСЪЖДАНЕ.....	36
IV. ИЗВОДИ.....	46
V. ПРИНОСИ.....	47
VI. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА.....	48
VII. ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ И НАУЧНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	49
VIII. РЕЗЮМЕ.....	50

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА

ГА - гранулоцитната анаплазма
ДДТ - дихлородифенилтрихлоретан
ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина
МЕ - моноцитната ерлихиоза
РНК - рибонуклеинова киселина
ЦТ – циклическа тромбоцитопения
АЛАТ - аланинаминотрансфераза
АЛР - алкална фосфатаза
АСАТ - аспартаминотрансфераза
Ва - абсолютен брой базофили
Ео - абсолютен брой еозинофили
ELISA - ензимно-свързан имуносорбентен анализ
HCT - хематокрит
HGB - хемоглобин
HRP - пероксидаза от хрян
IFA - индиректен имунофлуоресцентен анализ
Ly - абсолютен брой лимфоцити
MCH - средна концентрация на хемоглобин в един еритроцит
MCHC - средна концентрация на хемоглобин в еритроцитите
MCV - среден обем на еритроцита
Мо - абсолютен брой моноцити
Neu - абсолютен брой неутрофили
PBS - фосфатен буфер
PCR - полимеразно верижна реакция
PLT – общ брой тромбоцити
RBC - общ брой еритроцити
RDW - ширина на еритроцитното разпределение
WBC - общ брой левкоцити

УВОД

Векторно-предаваните болести са разнородна група заболявания, които се причиняват от патогени, пренасяни от членестоноги вектори, като комари, бълхи, кърлежи и пясъчни мухи (Dantas-Torres & Otranto, 2016). В световен мащаб те представляват приблизително 17% от всички инфекциозни болести (Otranto et al., 2009). През последните години се наблюдава глобално световно разпространение на паразитните вектори и патогените, които те пренасят. Това е повлияно от промените в околната среда и климата, засилената международна търговия, увеличеният и по-бърз глобален транспорт, прогресивното нарастване на човешкото население, броя на отглежданите животни, и не на последно място от нововъзникващата лекарствена резистентност както сред векторите, така и при патогените (Knols & Takken, 2007). Болестите, пренасяни от кърлежи имат все по-нарастващо значение във ветеринарната и хуманната медицина (Vayssier-Taussat et al., 2015). Броят на патогените, предавани от кърлежи, е по-висок от всички други членестоноги взети заедно, което ги прави най-сериозните зоонозни вектори в зоните с умерен климат, вкл. Европа (Munderloh, 2017, Anderson et al., 2018, Krämer et al., 2020).

Кучешките векторно-предавани болести (CVBD) са група от често срещани заболявания, които през последните години показват все по-бързо териториално разпространение. Освен ветеринарно значение, за редица от тях е доказан и зоонозен характер (Otranto et al., 2009). Кучетата могат да носят няколко патогена едновременно, които да причинят заболяване при хора (Chomel & Sun, 2011).

През последните десетилетия бяха открити голям брой рикетсийни патогени (Parola et al., 2005a; Nicholson et al., 2010). Те включват *Ehrlichia canis* (*E. canis*), *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*), *Anaplasma platys* (*A. platys*) и други (Parola et al., 2013). В някои случаи тези микроорганизми са открити първоначално при кърлежи и по-късно са установени и като човешки патогени (Parola et al., 2005a). За Европа основните заболявания от тази група са моноцитната ерлихиоза (МЕ) причинявана от *E. canis*, гранулоцитната анаплазмоза (ГА) с етиологичен

агент *A. phagocytophilum* и цикличната томбоцитопения предизвиквана от *A. platys*. Вектори са твърди кърлежи от род *Ixodes*. Редица инфекции с представители на сем. *Anaplasmataceae* са “обща” между хората и придружаващите ги животни (Nicholson et al., 2010). *E. canis*, предавана от *R. sanguineus* не се счита за агент със значителен зоонозен потенциал, въпреки че са докладвани случаи на инфекция при хора. Обаче, заразявания с *E. chaffeensis* и *E. ewingii* (предавани от *Amblyoma americanum*) са добре документирани (Perez et al., 2006). През последните години все по-голямо значение за човешкото здраве се отдава на *A. phagocytophilum* (Mencke et al., 2013). Резервоарните видове за тази инфекция са гризачи, диви и домашни тревопасни животни, кучета и котки.

Инфекциите при хора, свързани с домашни животни, се очертават като значителен проблем в Европа и Северна Америка. Изследване в Словения показва, че антитела срещу *A. phagocytophilum* са открити в 15,4% от изследваните кръвни проби от хора (Tozon et al., 2003). Проучванията върху наличието и разпространението на тази група заболявания в България започват в началото на 21-ви век. МЕ по кучетата в България бе доказана за първи път през 2002-2003 г. в развъдник в района на Пловдив (Tsachev, 2006a). Впоследствие е установена серопревалентност от 37,5% в северната част на страната и 30% в южната (Tsachev et al., 2006b, c). През 2008 е констатирана и инфекция с *A. phagocytophilum* (Tsachev et al., 2008). След първоначалното откриване на тези две инфекции бяха проведени редица сероепидемиологични проучвания сред домашни и безпризорни кучета в различни райони на страната. Въпреки това досега липсват изследвания, потвърждаващи/отхвърлящи активна инфекция чрез доказване геном на етиологичните агенти при серопозитивни кучета с клиничните признаци и хематологичните отклонения за МЕ, ГА и ЦТ. Този факт провокира нашето внимание и опит да проведем задълбочени диагностични проучвания на тези заболявания в България.

Ерлихиозата и анаплазмозата са сред най-често срещаните заразни заболявания при кучетата, които по честота през последните години изместват някои класически заразни заболявания, като парвовирусната и

ганата. Докато при традиционните, остропротичащи инфекции с кучешките парво/морбили-вируси, имунопрофилактиката доведе до значително понижение в инцидентността, то при рикетсиозите понастоящем не са налични ваксини за профилактика и контрол. Този факт налага своевременна, надеждна диагностика, помагаща в решението на ветеринарните лекари в клиниките за домашни любимци дали да започнат или не етиотропна терапия. Предвид страничните ефекти от лекуването с тетрациклинови антибиотици, третирането с тях на микробиологично здрави кучета е необосновано, а в някои случаи може да бъде и със сериозни здравни последици.

Вариабилността на клиничните признаци, голяма част от които са неспецифични, разнопосочните хематологични промени в различните фази на МЕ, ГА и ЦТ, недостатъците на клиничните серологични тестове налагат използването в рутинната практика на по-чувствителни и специфични лабораторни диагностични методи.

PCR изследването на кръвни и тъканни проби е чувствителен и специфичен диагностичен метод. Отрицателния PCR резултат, обаче никога не изключва инфекция. Терапията с доксициклин може да доведе до елиминиране на *E. canis* от кръвта, но с перзистирание на причинителя в някои органи (слезка, лимфни възли и костен мозък). Следователно след началото на лечението, установяването на причинителя посредством микроскопски или молекулярно-генетични методи може да бъде невъзможно, а това да доведе до фалшивонегативни резултати. В същото време образуваните вече антитела персистират за повече от една година и серологичното изследване може да е положително дълго след микробиологично оздравяване.

Наложително е след диагноза ерлихиоза или анаплазмоза, въз основа на болестни симптоми, хематологични и биохимични промени, и положителен клиничен серологичен тест да се продължи диагностичният алгоритъм. Препоръчително е използването на методи, които доказват сероконверсия комбинирана с PCR.

I. СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ

1. ЦЕЛ

Да се извършат диагностични проучвания чрез клинични, хематологични, антителни и молекулярно-генетични, изследвания, като се анализират клиничните признаци, хематологичните и биохимични промени при съмнителни/потвърдени пациенти за моноцитна ерлихиоза, гранулоцитна анапламоза, циклична тромбоцитопения, вкл. и при протичането им като ко-инфекции при кучета в България.

ЗАДАЧИ

За изпълнение на предвидената цел бяха поставени следните научни задачи:

1. Провеждане на клинични прегледи, хематологични и биохимични изследвания за подбиране на достатъчен брой кучета за включване в изследвания за МЕ, ГА и ЦТ.
2. Извършване на няколко различни видове антителни клинични тестове за МЕ и ГА с анализ на резултатите.
3. Извършване на няколко различни видове антителни лабораторни тестове за МЕ и ГА с анализ на резултатите.
4. Апробиране на PCR протокол за детекция на сем. *Anaplasmataceae* - *E. canis*.
5. Апробиране на PCR протокол за детекция на сем. *Anaplasmataceae* - *A. phagocytophilum*.
6. Апробиране на PCR протокол за детекция на сем. *Anaplasmataceae* - *A. platys*.
7. Съпоставяне и анализ на резултатите: PCR/серология/клинична картина/хематология/биохимия.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

2.1. Животни и проби

За включване в проучванията бяха подбрани 106 кучета. На всички тях предварително беше извършен клиничен преглед. За установяване наличие на признаци, насочващи за МЕ/ГА/ЦТ бе използван чек лист, представен на таблица 1.

Таблица 1. Клинични признаци за включване в проучването.

Летаргия		Куцота	
Треска		Повръщане	
Анорексия		Диаричен синдром	
Загуба на тегло		Бъбречна недостатъчност	
Лесна уморямост		Гнойно-катарален ринит	
Спонтанни кръвоизливи (Епистаксис/Ринорагия)		Артрит/ Полиартрит	
Анемия на видимите лигавици		Диспнея	
Увеличени лимфни възли		Нервна симптоматика	
Кожни лезии		Аборти	
Отоци в долните части на крайници		Неонанатална смърт	
Очни изменения (хеморагии, опацитации и други)		Мелена	

Основание за включване в изследванията бе наличие на поне 5 от търсените симптома. Така подбраните 106 кучета бяха пациенти на клиниката за дребни животни към университетската болница на Тракийския университет в Стара Загора. При всички тях имаше данни за предходни инвазии с кърлежи.

От всички 106 кучета бяха получени кръвни проби от *vena cephalica antebrachii externa* с помощта на вакуумтейнери с EDTA.

2.2. Хематологични и биохимични изследвания

Изследваните показатели включваха: общ брой левкоцити (WBC); абсолютен брой: неутрофили (NEU), лимфоцити (LY), моноцити (MO), еозинофили (EO), базофили (BA); общ брой еритроцити (RBC);

хемоглобин (HGB); хематокрит (HCT); еритроцитни индекси: среден обем на еритроцита (MCV), средна концентрация на хемоглобин в отделния еритроцит (MCH), средна концентрация на хемоглобин в еритроцитите (MCHC), ширина на еритроцитното разпределение (RDW). Отчетени бяха и промените в големината и формата на еритроцитите и общия брой тромбоцити (PLT). Кръвните изследвания бяха извършени на автоматичен хематологичен анализатор MINDRAY BC-5000 Vet (Shenzhen Mindray Animal Medical Technology Co., Ltd.). За референтни приехме стойностите, заложили в софтуера на апарата.

При плазмените проби беше извършено определяне на креатин, урея, аланин аминотрансфераза (ALAT), аспартат аминотрансферазата (ASAT), алкална фосфатаза (ALP), общ белтък, албумин, глобулин и албумин/глобулиново съотношение на автоматичен биохимичен анализатор MINDRAY BS-120 (Mindray Medical India Pvt. Ltd.). Стойностите заложили в софтуера на апарата бяха утвърдени за референтни.

2.3. Серологични изследвания

Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) - SNAP® 4Dx® Plus - клиничен серологичен тест. Пробите бяха изследвани за IgG-специфични антитела срещу *A. phagocytophilum*/*A. platys*, *E. canis/ewingii* и *B. burgdorferi*, както и за специфичен антиген на *D. immitis* чрез комерсиален ELISA кит (SNAP® 4Dx® Plus, IDEXX Laboratories, Inc. САЩ).

Индиректна имунофлуоресцентна микроскопия.

За установяване на анти-*E. canis* IgG антитела и анти-*A. phagocytophilum* IgG антитела в плазмени проби използвахме китове за индиректна имунофлуоресценция Mega FLUO® *Ehrlichia canis* (Megacor Diagnostik GmbH, Austria и Mega FLUO® *Anaplasma phagocytophilum* (Megacor Diagnostik GmbH, Austria). Изследванията бяха извършени

съгласно препоръките на производителя. Наличие на флуоресценция при разреждане на серума $\geq 1:40$ бе приемана за положителен резултат (Megacor Diagnostik GmbH, Austria 2018).

Всички положителни проби разреждахме допълнително чрез серийни двукратни разреждания до 1:640 за определяне на граничния антителен титър (максималното разреждане на серума, при което се наблюдава имунофлуоресценция).

Индиректна ELISA. Изследвани бяха 106 плазмени проби за IgG антитела срещу *A. phagocytophilum* и *E. canis* с комерсиални ELISA китове:

- Anti-*E. canis* ELISA Dog (IgG) (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Luebeck, Germany) и
- Anti-*Anaplasma phagocytophilum* ELISA Dog (IgG) (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Luebeck, Germany).

Тестването на пробите беше извършено съгласно инструкциите на производителя. Калкулацията на резултатите извършихме чрез спектрофотометрично измерване на оптичната екстинкция - 450 nm дължина на вълната и референтна дължина 620 nm. За целта използвахме полуавтоматична ELISA система – ELISA Rider LEDETECT 96 (Labexim Produkt, Biomed Dr.Weisser GmbH, Austria) и ELISA Washer.

Резултатите бяха изчислявани полуколичествено чрез определяне на екстинкционния коефициент на контролата или пробата спрямо екстинкционната стойност на калибратора при използване на формулата:

$$\text{Екстинкционен коефициент} = \frac{\text{Екстинкция на контролата или пробата}}{\text{Екстинкция на калибратора}}$$

Проби с Екстинкционен коефициент $< 0,8$ бяха определяни като негативни, проби с Екстинкционен коефициент $> 0,8 < 1,1$ бяха отчитани като гранични (съмнителни) и проби с Екстинкционен коефициент $> 1,1$ бяха означавани като позитивни.

2.4. Молекулярно-генетични изследвания

ДНК екстракция. За изолирането на ДНК беше използван кит за екстракция на ДНК - High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Всички 106 кръвни проби бяха изследвани. Таргетната ДНК екстрахирахме съгласно инструкциите на производителя:

Концентрацията на екстрахираната ДНК бе определяна чрез спектрално измерване на абсорбция при 260 и 280 nm и изчисление на коефициента A260/280 в NanoDrop - 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Получената пречистена ДНК бе съхранявана при -20°C до извършване на следващите PCR реакции.

Полимеразно верижна реакция (PCR).

❖ Протокол (1) за доказване на 345 bp сегмента от генетичната последователност на сем. *Anaplasmataceae* в кучешка кръв

За PCR изследването използвахме праймерите:

- прав - **EHR 16SD – F- 5`- GGTACCYACAGAAGAAGTCC - 3`** и
- обратен **EHR 16SR – R - 5`- TAGCACTCATCGTTTACAGC - 3`**.

Тази двойка праймери амплифицира различни видове, принадлежащи към сем. *Anaplasmataceae*, включително *Ehrlichia canis*, *E. chaffensis*, *E. muris*, *Anaplasma marginale*, *A. equi*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. centrale*, *Wolbachia pipientis*, *Neorickettsia senetsu*, *N. risticii*, *N. helminthoeca* (Inokuma et al., 2001).

Реакционната смес за PCR бе изготвяна в краен обем от 20µl. Тя се състоеше от 10 µl готов за употреба микс PCR буфер (КАРА2G Robust Hot Start ReadyMix with dye 2x), със стандартизирана концентрация на Taq ДНК полимеразата (1U), смес от дезоксирибонуклеотидфосфати (dNTP – 0,2 mM) и магнезиев хлорид (1,5 mM). Буферът съдържа две инертни багрила, които позволяват директно добавяне на PCR продуктът върху агарозен гел за анализ чрез гел-електрофореза. Към PCR микса бяха добавяни по 10

pmol от всеки прав и обратен праймер, 2 µl таргетна ДНК и стерилна дейонизирана вода до крайния обем.

При всеки PCR-анализ бяха използвани положителна и отрицателна контрола. Отрицателната контрола съдържаеше всички компоненти на PCR-микса с изключение на ДНК-матрица (NTC – non-template control), а като положителна контрола използвахме положителни ДНК-проби за геном на *E. canis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys*, предоставени любезно от проф. Хандан Четинкая от катедрата по паразитология към Веринарномедицинския факултет на Истанбулския университет, Турция. Използваните праймери са описани в таблица 2.

Таблица 2. Последователност от праймери, използвани при амплификацията 345 bp сегмент от рибозомалния ген 16S rRNA (Parola et al., 2000).

Праймери	Последователност 5`-> 3`
EHR 16SD – прав (F)	GGT-ACC-YAC-AGA-AGA-AGT-CC
EHR 16SR – обратен (R)	TAG-CAC-TCA-TCG-TTT-ACA-GC

Така подготвените PCR микроепруветки бяха поставяни в предварително настроен термосайкълър - апарат за PCR анализ с градиентен блок модел AERIS BG096 (Esco Micro Pte Ltd, Singapore). В таблица 3 е представена програмата за амплификация на 345 bp сегмента от рибозомалния ген 16S rRNA на рикетсиите от сем. *Anaplasmataceae*.

Таблица 3. Програма за PCR реакция за откриване на нуклеотидна последователност за сем. *Anaplasmataceae*.

Етапи на PCR	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	3 минути	1
Денатурация	94°C	30 секунди	35
Анелинг	55°C	35 секунди	
Амплификация	72°C	35 секунди	
Финална екстензия	72°C	7 минути	1
Край	4°C	∞	

След приключване на програмата, пробите бяха изваждани от апарата и накапвани на 1,5% агарозен гел за електрофореза.

❖ **Протокол (2) за доказване на 409 bp фрагмент от 16S rRNA гена на *E. canis* в кучешка кръв**

Всички положителни проби за 345 bp фрагмента на 16S rRNA гена на сем. *Anaplasmatacea* бяха изследвани за *E. canis*. За целта бе извършена PCR реакция с праймери специфични за 409 bp фрагмента от 16S rRNA гена на *E. canis*.

Реакционната смес за PCR бе приготвяна в краен обем от 20µl по описания в протокол 1 начин, но с малка модификация чрез добавяне на допълнително количество MgCl₂ до крайна концентрация 5 mM към PCR буфера.

Таблица 4. Нуклеотидна последователност на праймери за откриване на вида *E. canis* (Inokuma et al., 2003).

Праймери	Последователност 5`-> 3`
CANIS прав (F)	CAA-TTA-TTT-ATA-GCC-TCT-GGC-TAT-AGG-A
GA1UR обратен (R)	GAG-TTT-GCC-GGG-ACT-TCT-TCT

Положителната и отрицателната контрола изготвихме по описаната вече процедура.

PCR реакцията бе извършвана в термосайкълър с градиентен блок AERIS BG096 (Esco Micro Pte Ltd, Singapore) при температурен режим, представен в таблица 5.

Таблица 5. Програма за PCR реакция за откриване на нуклеотидна последователност за вида *E. canis*.

Етапи на PCR	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	5 минути	1
Денатурация	94°C	30 секунди	40
Анелинг	63°C	30 секунди	
Амплификация	72°C	90 секунди	
Финална екстензия	72°C	5 минути	1
Край	4°C	∞	

Амплификационният продукт беше визуализиран на 1,5% агарозен гел за електрофореза.

❖ **Протокол (3) за доказване на 444 bp фрагмента от *ank A* гена от генетичната последователност на вида *A. phagocytophilum* в кучешка кръв.**

PCR реакцията извършихме с праймери специфични за 444 bp фрагмента от *ank A* гена на *A. phagocytophilum*.

Реакционната смес за PCR реакцията бе изготвена в краен обем от 20 µl - 10x PCR буфер, 1,5mM MgCl₂, 0.2 mM смес от дезоксирибонуклеотид трифосфати (dNTP`s), 1U Taq ДНК полимераза, 10 pmol от всеки прав и обратен праймер, 2µl ДНК-проба и стерилна дейонизирана вода до крайния обем.

В таблица 6 е представена последователността на праймерите за фрагмента от *ank A* гена на *A. phagocytophilum*.

Таблица 6. Нуклетиотидна последователност на праймери за откриване на организми от вида *A. phagocytophilum* (Caturegli et al., 2000; Walls et al., 2000)

Праймери	Последователност 5`-> 3`
LA1 – прав (F)	GAG-AGA-TGC-TTA-TGG-TAA-GAC
LA6 – обратен (R)	CGT-TCA-GCC-ATC-ATT-GTG-AC

PCR реакцията бе извършвана в термосайкълър с градиентен блок AERIS BG096 (Esco Micro Pte Ltd, Singapore) при температурен режим, представен в таблица 7.

Амплификационните продукти от PCR реакцията визуализирахме на 1,5% агарозен гел за електрофореза

Таблица 7. Програма за PCR реакция за откриване на нуклеотидна последователност за организми от вид *A. phagocytophilum*.

Етапи на PCR	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	5 минути	1
Денатурация	94°C	30 секунди	35
Анелинг	44,2°C	30 секунди	
Амплификация	72°C	30 секунди	
Финална екстензия	72°C	7 минути	1
Край	4°C	∞	

❖ Протокол (4) за оптимизиране на температурата на амплификация на праймерите за доказване на *ankA* гена на *A. phagocytophilum* чрез градиентен PCR

За определяне на оптималната температура за амплификация на праймерите, които бяха използвани за доказване на *ankA* гена на *A. phagocytophilum* бе извършен градиентен PCR. Реакционната смес бе изготвена в краен обем от 20 µl за 12 проби и във всяка епруветка бе тествана положителната контрола за *A. phagocytophilum* с еднаква изходна концентрация на ДНК. Всяка реакционна смес беше приготвяна по начина описан в протокола от т. 3.

PCR реакцията извършвахме с програма за градиентният режим на термосайкълъра. В протокола бе зададена температура от 44°C до 52°C за анейлинга. В таблица 8 е представен температурния протокол за градиентния PCR за определяне на оптималната температура за амплификация на праймерите LA1 и LA6

Амплификационните продукти от PCR реакцията визуализирахме на 1,5% агарозен гел за електрофореза.

Таблица 8. Температурен протокол за градиентен PCR за определяне на оптимална температура на амплификация на праймерите за доказване на *ankA* гена на *A. phagocytophilum*.

Етапи на PCR	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	95°C	5 минути	1
Денатурация	94°C	30 секунди	35
Анейлинг	44°C - 52°C	30 секунди	
Амплификация	72°C	30 секунди	
Финална екстензия	72°C	7 минути	1
Край	4°C	∞	

❖ **Протокол (5) за доказване на 678 bp фрагмента от 16S rRNA гена от генетичната последователност на вида *Anaplasma platys* в кучешка кръв**

PCR реакцията беше извършена с праймери специфични за 678 bp фрагмента от 16S rRNA гена на *A. platys*.

Реакционната смес за PCR реакцията беше приготвяна в краен обем от 20 µl - 10x PCR буфер, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM смес от дезоксирибонуклеотид трифосфати (dNTP`s), 1,25 U Taq ДНК полимераза, 10 pmol от всеки прав и обратен праймер, 2µl ДНК-проба и стерилна дейонизирана вода до крайния обем.

За всяка реакция беше изготвяна положителна и отрицателна контрола. В таблица 9 е представена последователността на праймерите за фрагмента от 16S rRNA гена на *A. platys*.

Таблица 9. Нуклетиотидна последователност на праймери за откриване на организми от вида *A. platys* (Inokuma et al., 2000).

Праймери	Последователност 5`-> 3`
PLATYS F – прав (F)	GAT-TTT-TGT-CGT-AGC-TTG-CTA-TG
EHR16SR – обратен (R)	TAG-CAC-TCA-TCG-TTT-ACA-GC

PCR реакцията беше извършена в термосайкълър с градиентен блок AERIS BG096 (Esco Micro Pte Ltd, Singapore) при температурен режим, представен в таблица 10.

Таблица 10. Програма за PCR реакция за откриване на нуклеотидна последователност за организми от вид *A. platys*.

Етапи на PCR	Температура	Време	Брой цикли
Начална денатурация	94°C	1 минути	1
Денатурация	94°C	30 секунди	40
Анейлинг	55°C	30 секунди	
Амплификация	72°C	30 секунди	
Финална екстензия	72°C	5 минути	1
Край	4°C	∞	

Получените амплификационни продукти бяха наблюдавани на 1,5% агарозен гел за електрофореза.

Агарозна гелелектрофореза

Гел-електрофорезата бе извършена на 1.5% агарозен гел към, който добавяхме 5 µl Ethidiumbromid (5,25 mg/ml). Върху горещия гел бе поставян гребен за образуването на 12 ямки. След втвърдяването на гела го заливахме с 10xTBE буферен разтвор (90 Mm Tris; 90 Mm Борна киселина; 1Mm Na₂EDTA). В образуваните 12 ямки поставяхме амплификационните продукти, предварително смесени с Bromphenol Blau. В една от ямките на гела бе поставян молекулен маркер за големина на амплификационните фрагменти в диапазон от 100 bp до 1000 bp. Частта на гела с ямките бе поставяна към отрицателния електрод, а другият край - към положителния електрод. Електрофорезата се провеждаше в продължение на 40 минути при 120V. Отчитането извършвахме под UV трансилюминатор чрез UV-гел фотодокументационна система.

Отчитането на амплификационните продукти от пробите направихме чрез съпоставяне големината на амплифицираните фрагменти с тези на молекуления маркер.

2.5. Статистически методи за обработка на данните

Доверителните интервали (confidence limits 95%) бяха определени с помощта на статистически софтуер GraphPad InStat v. 3.00.

Процентът на съответствие между тестовете беше изчислен по формулата:

$$\text{Процент на съответствие} = \frac{\text{Брой проби със съвпадащи резултати}}{\text{Общ брой тествани проби}} \times 100$$

Стойностите от 0 - 20%, 21 - 40%, 41 - 60%, 61 - 80% и 81 - 100% се считат съответно за нисък, добър, умерен, неоспорим и висок процент на съответствие.

Връзката между резултатите, получени със серологичната техника и молекулярния тест, беше оценено с помощта на индекса на Cohen's Карра. Стойностите на индекса от 0, няма; 0-0,2 слабо; 0,2-0,4 добро; 0,4-0,6 умерено; 0,6-0,8 значимо; и 0,8-1,0 почти перфектно; 1 перфектно съответствие.

II. РЕЗУЛТАТИ

1. Клинични признаци

Всички 106 кучета, включени в изследванията бяха пациенти на клиниката за дребни животни към Университетската ветеринарна болница при Тракийския университет в Стара Загора и бяха насочвани към отделението по заразни и паразитни болести. При първоначалният клиничен преглед търсехме наличие на 5 и повече признака насочващи към МЕ, ГА и ЦТ. При всички пациенти включени в проучването, стопаните съобщаваха за предходни инвазии с кърлежи или при клиничния преглед бяха наблюдавани такива.

Значителна част от кучетата бяха с влошено общо състояние. Най-честите клинични симптоми, които установихме бяха депресия (85.85%), фебрилитет (83.96%), анорексия (73.58%), загуба на тегло (70.75%), лесна уморяемост (64.15%), спонтанни кръвоизливи - най-често ринорагия (61.32%). Обобщените резултати са представени на таблица 11.

Таблица 11. Клинични признаци, установени при първоначалния преглед.

Клиничен признак	Брой	Процент (CL*)		Брой	Процент (CL)
Летаргия	91	85.85 (77.74÷91.86)	Куцота	29	27.36 (19.15÷36.87)
Треска	89	83.96 (75.57÷90.37)	Повръщане	25	23.58 (15.88÷32.82)
Анорексия	78	73.58 (64.13÷81.68)	Диаричен синдром	23	21.70 (16.39÷29.72)
Загуба на тегло	75	70.75 (61.13÷79.19)	Бъбречна недостатъчност	21	19.81 (12.70÷28.68)
Лесна уморяемост	68	64.15 (54.26÷73.23)	Гнойно-катарален ринит	18	16.98 (10.39÷25.50)
Спонтанни кръвоизливи	65	61.32 (51.37÷70.62)	Артрит/Полиартрит	16	15.09 (8.88÷23.35)
Анемия	54	50.94 (41.05÷60.78)	Диспнея	15	14.15 (8.14÷22.26)
Увеличени лимфни възли	53	50.00% (40.13÷59.87)	Нервна симптоматика	13	12.26 (6.69÷20.06)
Кожни лезии	51	48.11 (38.30÷58.03)	Аборти	5	4.72 (1.55÷10.67)
Отоци в ниските части на крайници	49	46.23 (36.49÷56.18)	С неонатална смърт	3	2.83 (0.59÷8.05)
Очни изменения	35	33.02 (24.19÷42.82)	Мелена	1	0.94 (0.02÷5.14)

* CL - confidence limit (доверителен интервал)

2. Хематологични изследвания

След като бе преценено, че клиничната симптоматика е съответстваща за МЕ, ГА и ЦТ извършихме хематологични и биохимични изследвания на кръвните проби получени от всички 106 кучета.

Най-често регистрираните отклонения под референтните норми бяха:

- ❖ **над 30%:**
 - тромбоцитопения 30.19% (32/106)
 - понижен хемоглобин 30.19% (32/106)
- ❖ **между 20 - 30% :**
 - лимфопения 28.30% (30/106)
 - неутропения 27.36% (29/106)
 - левкопения 26.42% (28/106)
 - понижен хематокрит 24.52% (26/106)
 - еритропения 23.58% (25/106)
 - понижена МСНС 21.70% (23/106)
- ❖ **под 20% :**
 - моноцитопения 18.87% (20/106)
 - MCV 18.70% (16/106)
 - MCH 14.15% (15/106)
 - еозинопения 12.26% (13/106)

Най-често регистрираните отклонения над референтните норми бяха:

- ❖ **над 30%:**
 - моноцитоза 30.19% (32/106)
- ❖ **между 20 - 30%:**
 - лимфоцитоза 25.47% (27/106)
- ❖ **под 20%**
 - неутрофилия 17.92% (17/106)

Обобщените резултати от хематологичните проучвания са представени в таблица 12.

3. Биохимични изследвания

Получените резултати при биохимичните изследвания на кръвните проби от 106 клинични пациента са представени в таблица 13.

Най-големи отклонения (над 20 %) бяха следните:

- хиперпротеинемия - 26.42% (28/106)
- хиперглобулинемия - 24.53% (26/106)
- хипоалбуминемия - 22.64% (24/106)

Останалите биохимични показатели не показаха съществени отклонения.

Таблица 12 Хематологични промени при кучета с клинични симптоми съответстващи за МЕ, ГА и ЦТ (n=106)

Показатели	Референтни стойности	Под референтните стойности		В границите на референтните стойности		Над референтните стойности	
		Брой	% (CL*)	Брой	% (CL)	Брой	% (CL)
RBC (10 ¹² /L)	5.10 – 8.50	25	23.58 (15.88÷32.82)	81	76.41 (67.18÷84.12)	0	0 (0÷3.42)
HGB (g/L)	110 – 190	32	30.19 (21.65÷39.88)	71	66.98 (57.18÷75.81)	3	2.83 (0.59÷8.05)
HCT (%)	33.0 – 56.0	26	24.52 (16.69÷33.84)	80	75.47 (66.16÷83.31)	0	0 (0÷3.42)
MCV (f/L)	60.0 – 76.0	18	16.98 (10.39÷25.50)	87	82.08 (73.43÷88.85)	1	0.94 (0.02÷5.14)
MCH (pg)	20.0 – 27.0	15	14.15 (8.14÷22.26)	91	85.85 (77.74÷91.86)	0	0 (0÷3.42)
MCHC (g/L)	300 - 380	23	21.70 (14.28÷30.76)	81	76.41 (67.18÷84.12)	0	0 (0÷3.42)
PLT (10 ⁹ /L)	117 – 490	32	30.19 (21.65÷39.88)	69	65.09 (55.22÷74.10)	5	4.72 (1.55÷10.67)
WBC (10 ⁹ /L)	6.0 – 17.0	28	26.42 (18.32÷35.87)	69	65.09 (55.22÷74.10)	9	8.49 (3.96÷15.51)
Lym (10 ⁹ /L)	0.83 – 4.91	30	28.30 (19.98÷37.88)	49	46.23 (36.49÷56.18)	27	25.47 (17.51÷34.86)
Mon (10 ⁹ /L)	0.14 – 1.97	20	18.87 (11.92÷27.62)	54	50.94 (41.05÷60.78)	32	30.19 (21.65÷39.88)
Neu (10 ⁹ /L)	52.0 – 81.0	29	27.36 (19.15÷36.87)	58	54.72 (44.75÷64.41)	19	17.92 (11.15÷26.57)
Eos (10 ⁹ /L)	0.5 – 10.0	13	12.26 (6.69÷20.06)	89	83.96 (75.57÷90.37)	4	3.77 (1.04÷9.38)
Bas (10 ⁹ /L)	0.0 – 1.3	0	0 (0÷3.42)	104	98.11 (90.11÷100)	2	1.89 (0.24÷6.65)

* CL - confidence limit (доверителен интервал)

Таблица 13 Биохимични промени при пациенти с клинични признаци съответстващи за МЕ, ГА и ЦТ.

Показатели	Референтни стойности	Под референтните стойности		В границите на референтните стойности		Над референтните стойности	
		Брой	% (CL*)	Брой	%(CL*)	Брой	%(CL*)
Креатинин (mmol/l)	40 - 120	0	0 (0÷3.42)	85	80.19 (71.32÷87.30)	21	19.81 (12.70÷28.68)
Уреа (mmol/l)	1.7 -7.4	0	0 (0÷3.42)	98	92.45 (85.67÷96.69)	8	7.55 (3.31÷14.33)
ALAT [U/l]	15 - 55	0	0 (0÷3.42)	87	82.08 (73.43÷88.85)	19	17.92 (11. 51÷26.57)
ASAT (U/l)	15 - 40	0	0 (0÷3.42)	89	83.96 (75.57÷90.37)	17	16.04 (9.63÷24.43)
AP (U/l)	1 - 85	0	0 (0÷3.42)	92	86.79 (78.40÷94.63)	14	13.21 (7.41÷21.17)
Общ белтък (g/l)	54 -78	0	0 (0÷3.42)	78	73.58 (64.13÷81.68)	28	26.42 (18.32÷35.87)
Албумин (g/l)	25 - 37	24	22.64 (13.64÷28.99)	82	77.36 (68.34÷85.12)	0	0 (0÷3.42)
Глобулин (g/l)	24 - 40	0	0 (0÷3.42)	80	75.47 (66.16÷83.31)	26	24.53 (16.69÷33.84)

* CL - confidence limit (доверителен интервал)

4. Серологични клинични изследвания

От 106 кръвни проби, изследвани със SNAP® 4Dx® Plus (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME), положителни за IgG антитела срещу *Ehrlichia* spp. бяха 62 (58.49%), за IgG антитела срещу *Anaplasma* spp 14 (13.21%), а едновременно и за *Ehrlichia* spp. и *Anaplasma* spp 24 (22.64%). В 6 (5.66%) проби не бяха установени антитела (Таблица 14). Всички проби бяха негативни за антитела срещу *B. burgdorferi* и антиген на *D. immitis* и кучетата не бяха с микрофиляриемия.

Табл. 14. Резултати от SNAP® 4Dx® Plus тестове за IgG срещу *Ehrlichia* spp. и *Anaplasma* spp.

	SNAP® 4Dx® Plus	
	Брой	Процент (CL*)
Положителни за <i>Ehrlichia</i> spp.	62	58.49 (48.51÷67.97)
Положителни за <i>Anaplasma</i> spp.	14	13.21 (9.41÷21.17)
Положителни за <i>Ehrlichia</i> spp. и <i>Anaplasma</i> spp.	24	22.64 (15.08÷31.79)
Негативни проби	6	5.66 (2.11÷11.91)
Общ брой проби	106	

* CL - confidence limit (доверителен интервал)

Същите 106 кръвни проби бяха изследвани и с използване на **индиректен имунофлуоресцентен тест** за антитела. Титър $\geq 1:40$, приет като положителен за наличие на IgG срещу *E. canis* беше установен при 63 (59.43%) от изследваните проби, а 14 (13.21%) от тях показваха наличие на антитела срещу *A. phagocytophilum*. В 23 (21.7%) бяха открити антитела едновременно срещу *E. canis* и *A. phagocytophilum*, а в 6 (5.66%) не бе установена серопозитивност срещу горните инфекциозни агенти (Таблица 15).

Табл. 15. Резултати от IFA тестове за IgG срещу *E. canis* и *A. phagocytophilum*

	Индиректен имунофлуоресцентен тест	
	Брой	Процент (CL*)
Положителни за <i>E. canis</i>	63	59.43 (49.46÷68.87)
Положителни за <i>A. phagocytophilum</i>	14	13.21 (9.41÷21.17)
Положителни за <i>E. canis</i> и <i>A. phagocytophilum</i>	23	21.70 (14.28-30.76)
Негативни проби	6	5.66 (2.11÷11.91)
Общ брой проби	106	

* CL - confidence limit (доверителен интервал)

С помощта на IFA за определяне на обхвата на титрите на антитела срещу *E. canis* и *A. phagocytophilum* бяха определени 86 положителни за *E. canis* и 37 за *A. phagocytophilum*. Отрицателни бяха 69 проби.

Обобщените резултати за разпределението на обхвата на титрите на антитела срещу *E. canis* и *A. phagocytophilum* са представени в Таблица 16.

Табл. 16. Резултати на титрите на антитела срещу *E. canis* и *A. phagocytophilum*.

	IFA титри					
	1:40 n (%) / (CL*)	1:80 n (%) / (CL)	1:160 n (%) / (CL)	1:320 n (%) / (CL)	1:640 n (%) / (CL)	Негативни n (%) / (CL)
анти- <i>Ehrlichia</i> Ab (n=106)	26 (24.53) (16.69÷33.84)	42 (39.62) (30.25÷49.59)	5 (4.72) (1.55÷10.67)	7 (6.60) (2.70÷13.13)	6 (5.66) (2.11÷11.91)	20 (18.87) (11.92÷27.62)
анти- <i>Anaplasma</i> Ab (n=106)	12 (11.32) (5.99÷18.94)	14 (13.21) (7.41÷21.17)	1 (0.94) (0.02÷5.14)	1 (0.94) (0.02÷5.14)	9 (8.49) (3.96-15.51)	69 (65.09) (55.22-74.10)

* CL - confidence limit (доверителен интервал)

Чрез **ELISA** китове на EUROIMMUN бе установено наличие на антитела срещу *E. canis* в 51 (48.11%) от пробите, 12 (11.32%) от пробите показаха наличие на антитела срещу *A. phagocytophilum*, а в 31 (29.25%) бяха положителни за антитела както срещу *E. canis*, така и срещу *A. phagocytophilum*. Дванадесет (11.32%) от пробите бяха отрицателни за антитела и срещу причинителите на МЕ и ГА (Таблица 17).

Табл. 17. Резултати от EUROIMMUN ELISA тестове за IgG срещу *E. canis* и *A. phagocytophilum*.

	EUROIMMUN ELISA Kit	
	Брой	Процент (CL*)
Положителни за <i>E. canis</i>	51	48.11 (38.30÷58.03)
Положителни за <i>A. phagocytophilum</i>	12	11.32 (5.99÷18.94)
Положителни за <i>E. canis/A. phagocytophilum</i>	31	29.25 (20.81÷38.87)
Негативни проби	12	11.32 (5.99÷18.94)
Общ брой проби	106	

* CL - confidence limit (доверителен интервал)

Сравнението на резултатите от серологичните тестове - показва 95.3% съвпадение за анти-*A. phagocytophilum* антитела между IFA и SNAP® 4Dx® Plus, при коефициент на Cohen к съответно 0.90, който се интерпретира като почти пълно съответствие.

По отношение на анти-*E. canis* антитела процента на съвпадение между IFA и SNAP® 4Dx® Plus беше 96.1, при коефициент на Cohen к 0.87, който отново показва почти пълно съответствие. Данните за положителни/отрицателни проби и статистическият анализ са представени в табл. 18.

Таблица 18. Връзка между SNAP® 4Dx® Plus тест и IFA за *A. phagocytophilum* и *E. canis*

<i>A. phagocytophilum</i>		IFA		Статистически анализ
		Pos	Neg	% на съвпадение: 95.3 Cohen's k 0.90 Почти пълно съответствие
SNAP® 4Dx®	Pos	35	3	
	Neg	2	66	
<i>E. canis</i>		IFA		Статистически анализ
		Pos	Neg	% на съвпадение: 96.1 Cohen's k: 0.87 Почти пълно съответствие
SNAP® 4Dx®	Pos	82	4	
	Neg	4	16	

При сравняване на IFA и EUROIMMUN ELISA Kit от една страна и SNAP® 4Dx® Plus и EUROIMMUN ELISA Kit статистическия анализ показва, че въпреки сходните проценти на съвпадение, изчислените Cohen's k съответстваха на значимо съответствие по отношение на анти-*A. phagocytophilum* антитела и умерено съответствие между тестовите за анти-*E. canis* антитела. Обобщените резултати за представени в табл. 19.

Таблица 19. Връзка между лабораторния ELISA тест и IFA за *A. phagocytophilum* и *E. canis*

<i>A. phagocytophilum</i>		IFA		Статистически анализ
		Pos	Neg	% на съвпадение: 87.0 Cohen's k 0.73 Значимо съответствие
EUROIMMUN ELISA Kit	Pos	33	10	
	Neg	4	59	
<i>E. canis</i>		IFA		Статистически анализ
		Pos	Neg	% на съвпадение: 86.8 Cohen's k: 0.60 Умерено съответствие
EUROIMMUN ELISA Kit	Pos	77	5	
	Neg	9	15	

При сравняването на резултатите от клиничния и лабораторния ELISA тестове установихме по-ниски стойности на процента на съвпадение и Cohen's k за SNAP® 4Dx® Plus и EUROIMMUN ELISA Kit (Таблица 20).

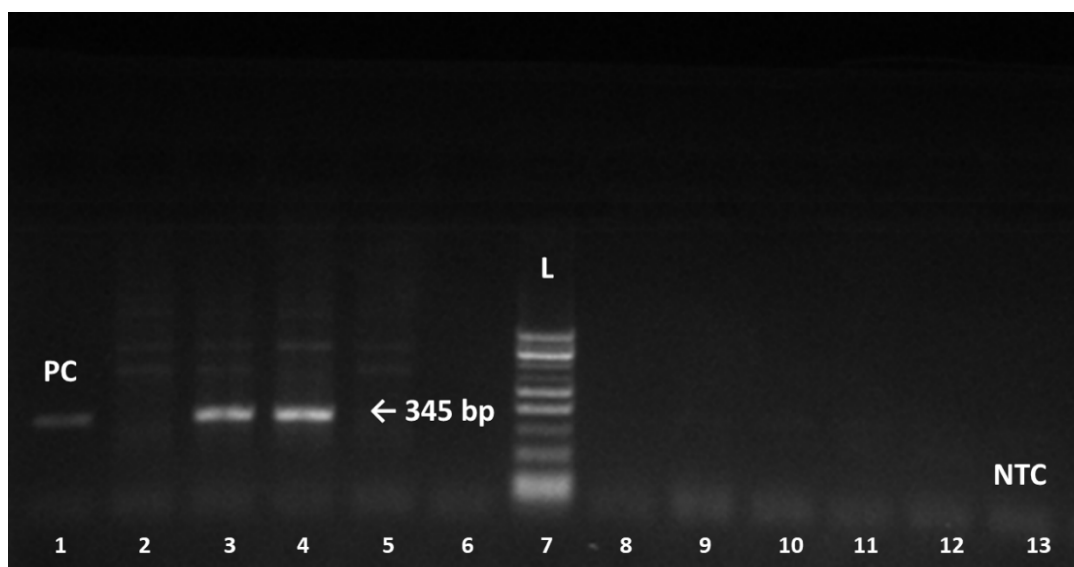
Таблица 20. Връзка между клиничния и лабораторния ELISA тестове за *A. phagocytophilum* и *E. canis*

<i>A. phagocytophilum</i>		EUROIMMUN ELISA Kit		Статистически анализ
		Pos	Neg	% на съвпадение: 78.3 Cohen's k 0.54 Умерено съответствие
SNAP® 4Dx®	Pos	29	9	
	Neg	14	54	
<i>E. canis</i>		EUROIMMUN ELISA Kit		Статистически анализ
		Pos	Neg	% на съвпадение: 84.9 Cohen's k: 0.54 Умерено съответствие
SNAP® 4Dx®	Pos	76	10	
	Neg	6	14	

6. PCR изследвания

Детекция на сем. *Anaplasmataceae*

Всички **106 кръвни проби** бяха подложени на PCR изследване за наличие на генетични последователности, специфични за *16S rRNK* гена на рикетсии от сем. *Anaplasmataceae*. От изследваните проби, **46 бяха положителни** за 345 bp сегмента на рибозомалния ген. В останалите 60 не установихме наличие на този генетичен сегмент. На фигура 1 са представени положителните (позиции 3 и 4) и отрицателните проби (2, 5, 6, 8-12). На позиция 1 е позитивната контрола (PC), с която сравнявахме получените амплификационни продукти. Номер 13 е отрицателната контрола (NTC), която свидетелства за отсъствие на амплификат или друг носител на генетична информация. Пробите сравнявахме с проба номер 7 – генетичен маркер от 100 до 1000 bp.

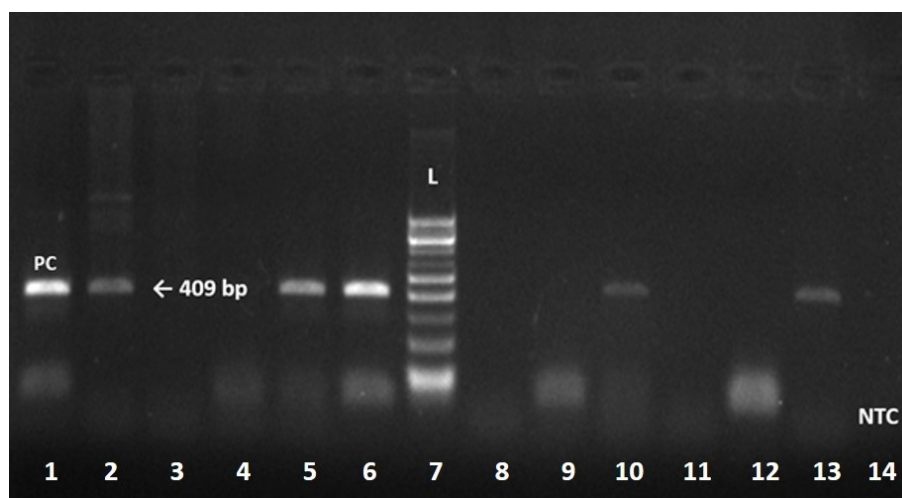


Фиг 1. Молекулярно генетична идентификация на 345 bp фрагмента от *16S rRNK* гена на род. *Anaplasmataceae* (1- положителна контрола; 3, 4 – положителни проби; 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 – отрицателни проби; 13 – отрицателна контрола; 7 – молекулен маркер)

Детекция *E. canis*

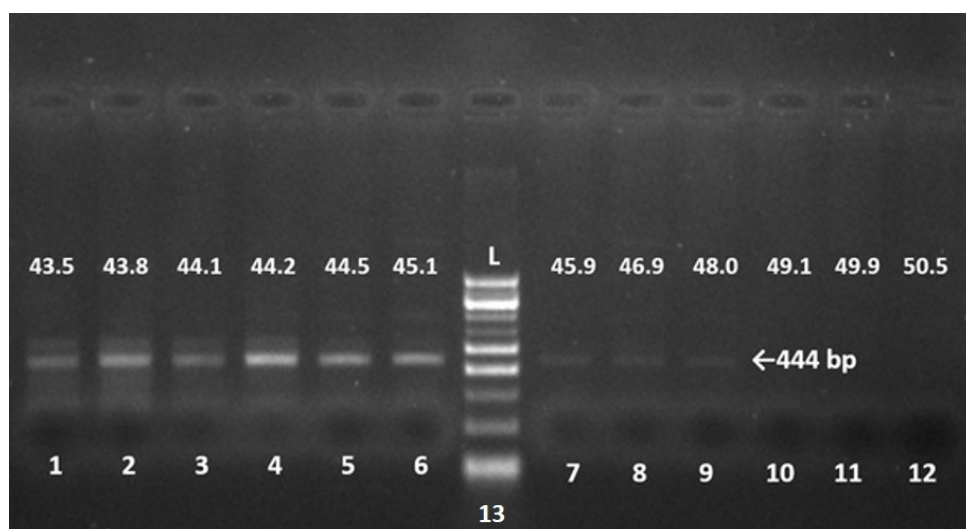
От 46 PCR положителни проби за сем. *Anaplasmataceae*, в **26** беше установен 409 bp фрагмента от *16S rRNK* гена на *E. canis*. На фиг. 2 са представени положителните и отрицателните проби. Позиция 1 на фигурата

съответства на положителната контрола (PC), на 14 - отрицателната контрола (NTC), а на 7 генетичния маркер. Положителни бяха пробите на позиции 2, 5, 6, 10, 13, а отрицателните на 3, 4, 8, 9, 11, 12



Фиг. 2. Молекулярно генетична идентификация на 409 bp фрагмента от 16S *rRNA* гена на *E. canis* (1 – положителна контрола; 2, 5, 6, 10, 13 – положителни проби; 3, 4, 8, 11 – отрицателни проби; 14 – отрицателна контрола, 7 – генетичен маркер)

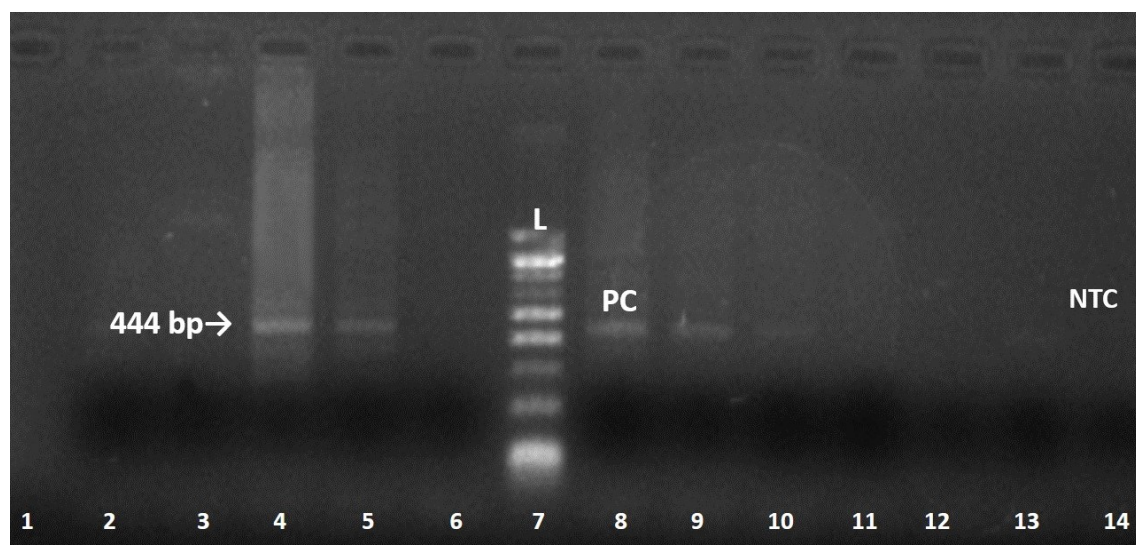
Фигура 3 отразява резултатите от градиентния PCR. В проби от 1 до 9 получихме амплификационни продукти. В останалите 3 не се наблюдаваха такива. Избрахме за оптимална температурата от 44.2°C, която съответстваше на ямка 4, където беше отчетена най-добра амплификация.



Фиг. 3. Градиентен PCR за праймери LA1 и LA6, използвани за определяне на генетичната последователност на 444 bp фрагмента от *ankA* гена на *A. phagocytophilum* (1 – 9 наличие на амплификация; 10 – 12 отсъствие на амплификация; 13 молекулен маркер).

Детекция на *A. phagocytophilum*

В общо 28 от 46-те положителни за сем. *Anaplasmatacea* беше установено наличие на 444 bp фрагмента от *ankA* гена на *A. phagocytophilum*. PCR реакцията за молекулярно генетичната идентификация на този фрагмент е представена на фиг. 4. На позиция 7 е генетичният маркер от 100 до 1000 bp, на 8 позитивната контрола (PC), а на 14 негативната контрола (NTC). На позиции 4, 5, 9 и 10 са положителните проби, а на 1, 2, 3, 6, 11, 12, 13 такива показващи отрицателен резултат.



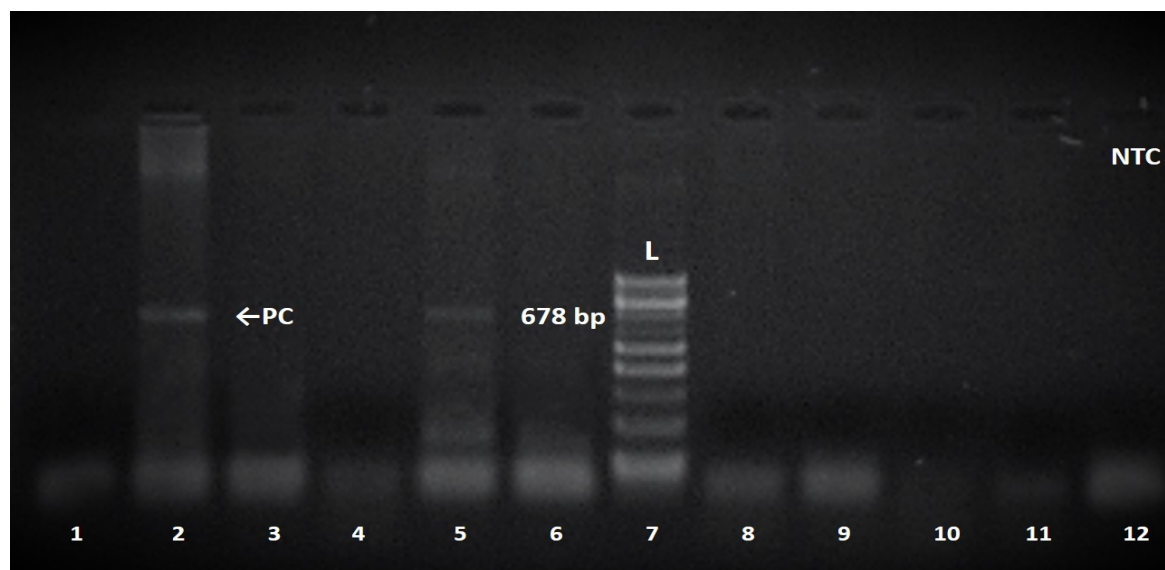
Фиг. 4. Молекулярно генетична идентификация на 444 bp фрагмента от *ankA* гена на *A. phagocytophilum*

Детекция на *A. platys*

В една от пробите, положителни за геном на сем. *Anaplasmatacea* не доказахме ДНК на *E. canis* или *A. phagocytophilum*. При последвалото изследване на всички 46 положителни за семейството проби, установихме наличие на 678 bp фрагмента от *16S rRNA* гена на *A. platys* в нея и в още една, с наличие на ДНК за *E. canis* и *A. phagocytophilum* едновременно – т. е. резултатът беше положителен и за трите патогена.

На фигура 5 е онагледена генната идентификация за 678 bp фрагмента от *16S rRNA* гена на *A. platys* на тестваните проби. Наличие на ампликони характерни за *A. platys*, наблюдавахме на позиция 5 (фиг. 5). Номер 7

съответства на генетичният маркер, 2 - позитивната контрола (PC), а 12 - негативната контрола (NTC).



Фиг. 5. Молекулярно генетична идентификация на 678 bp фрагмента реципрочен на 16S *rRNA* ген на *A. platys* (2 – положителна контрола; 5 – положителна проба; 1,3,4,6, 8, 9, 10, 11 – отрицателни проби; 12 – отрицателна контрола

Обобщените резултати от PCR изследването (таблица 21) показаха: 46 проби положителни за сем. *Anaplasmatacea*. От тях 17 положителни само за *E. canis*; 19 положителни само за *A. phagocytophilum*; 1 положителна само за *A. platys*; 8 положителни за *E. canis* и *A. phagocytophilum*; 1 положителна за *E. canis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys*.

Табл. 21. Обобщени резултати от PCR изследвания на 106 проби от кучета.

Резултат PCR	Брой	% (CL)*
PCR + <i>E. canis</i>	17	16.03 (9.63÷24.43)
PCR + <i>A. phagocytophilum</i>	19	17.92 (11.15÷ 26.57)
PCR + <i>A. platys</i>	1	0.94 (0.02÷5.14)
PCR + <i>E. canis/A. phagocytophilum</i>	8	7.56 (3.31÷14.33)
PCR + <i>E. canis/A. phagocytophilum</i> + <i>A. platys</i>	1	0.94 (0.02÷5.14)
PCR -	60	56.6 (46.63÷66.20)

* CL - confidence limit (доверителен интервал)

6. Съпоставяне на резултатите - PCR/серология/клинична картина/хематология/биохимия

На база PCR (+) и Ab (+/-) проби бяха формирани 5 групи пациенти с **активна инфекция** (наличие на патогена в кръвта) - *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* и ко-инфекции. За по-ясно отчитане и интерпретиране на останалите получени резултати, бяха формирани и още 3 групи включващи PCR негативните кучета.

❖ **1. При 17 пациенти е налице активна МЕ *E. canis* - 15 PCR(+)/Ab(+) и 2 PCR(+)/Ab(-) - с доминиращи над 50% клинични признаци:** анорексия, треска, летаргия, загуба на тегло, лесна уморяемост, спонтанни кръвоизливи, анемия на видимите лигавици, увеличени лимфни възли, очна патология и куцота (табл. 22). Основните промените в хематологичните показатели включваха: тромбоцитопения, левкопения, лимфопения и неутропения (табл. 23). Отклоненията в биохимичните показатели не бяха съществени (табл. 24).

❖ **2. При 19 пациенти беше налице активна ГА *A. phagocytophilum* - 18 PCR(+)/Ab(+) и 1 PCR(+)/Ab(-) - с доминиращи над 50% клинични признаци:** летаргия, треска, анорексия, загуба на тегло, спонтанни кръвоизливи и анемия на видимите лигавици (табл. 22). Най-често наблюдаваните отклонения в стойностите на показателите от червената и бяла кръвна картина включваха: еритропения, понижени стойности на хематокрита и тромбоцитопения, левкопения, лимфопения, неутропения (табл. 23). Отклонения в биохимичните показатели на кръвта бяха наблюдавани при единични животни. Отново най-често беше установено повишение в ASAT (табл. 24).

❖ **3. При 1 пациент беше налице активна ЦТ *A. platys* /PCR(+)/Ab(+).** Клиничните признаци, хематологичните промени и отклоненията в биохимичните показатели са представени в таблици 22-24.

❖ **4. При 8 пациенти беше установена активна ко-инфекция ГА-МЕ (PCR(+)/Ab(+))** едновременно за *A. phagocytophilum* и *E. canis* с

доминиращи над 50% клинични признаци: летаргия, треска, анорексия, загуба на тегло, лесна уморяемост, спонтанни кръвоизливи, анемия на видимите лигавици, кожни лезии, увеличени лимфни възли, отоци в ниските части на крайниците, очни изменения и куцота (табл. 22). При кучетата с ко-инфекции с по-значимите отклонения в изследваните хематологични показатели бяха: тромбоцитопения, левкоцитоза, гранулоцитоза, понижени стойности на хематокрита, еритропения, хемоглобинемия, лимфопения и лимфоцитоза (табл. 23). При кучетата с ко-инфекции много по-често установявахме биохимични отклонения - повишени нива на креатинин и урея; ALAT, ASAT и ALP, общ белтък и глобулините, при понижено количество на албумините в кръвта (табл. 24).

❖ 5. При 1 пациент беше налице **активна ко-инфекция ГА-ЦТ-МЕ** *A. phagocytophilum/A. platys/E. canis* (PCR(+)/Ab(+). Клиничните признаци, хематологичните промени и отклоненията в биохимичните показатели са представени в таблици 22-24.

❖ 6. Отрицателен PCR резултат е установен при 56 кучета с Ab(+) само срещу *E. canis* и 6 кучета с Ab(+) само срещу *A. phagocytophilum*, въпреки, че серопозитивните, PCR негативни животни показваха клинични признаци, хематологични отклонения характерни за МЕ, ГА и ЦТ (табл. 22-24).

❖ 7. В пробите на 4 Ab(+) животни бе открита **ко-инфекция** - Ab(+) *E. canis* Ab(+)/*A. phagocytophilum* – но геном на нито един от тези микроорганизми не беше установен (**PCR (-)**).

❖ 8. При 6 от кучетата с **PCR (-)/ЕС Ab(-); АР Ab(-)** регистрираните клинични признаци бяха сходни с тези, регистрирани при МЕ, ГА и ЦТ. По-значимите отклонения в изследваните хематологични показатели включваха левкоцитоза, гранулоцитоза и еозинопения. Биохимичните изследвания на кръвта показаха повишаване на общия белтък и глобулиновата фракция, с понижени нива на албумините и повишен ALAT (табл. 22-24).

**Табл. 22. Честота на клиничните симптоми при кучетата с
активна *E. canis*, *A. phagocytophilum*, ко-инфекция и с PCR (-) Ab (-)**

	активна МЕ PCR(+)/Ab(+) = 15 PCR(+)/Ab(-) = 2 (n = 17)		активна ГА PCR(+)/Ab(+) = 18 PCR(+)/Ab(-) = 1 (n = 19)		активна ко-инфекция PCR (+)/ EC* Ab (+); AP** Ab (+) (n = 8)		PCR (-) / EC Ab (-); AP Ab (-) (n = 6)	
	N	% (CL***)	N	% (CL)	N	% (CL)	N	% (CL)
Летаргия	15	88.24 (63.56÷98.54)	17	89.47 (66.86÷96.79)	7	87.50 (47.35÷99.68)	4	66.67 (22.28÷95.67)
Треска	16	94.12 (71.31÷99.85)	16	84.21 (60.42÷96.62)	7	87.50 (47.35÷99.68)	3	50.00 (11.81÷88.19)
Анорексия	15	88.24 (63.56÷98.54)	13	68.42 (43.45÷87.42)	7	87.50 (47.35÷99.68)	3	50.00 (11.81÷88.19)
Загуба на телло	14	82.35 (56.57÷96.2)	11	57.89 (33.50÷79.75)	6	75.00 (34.91÷96.81)	2	33.33 (4.33÷77.72)
Лесна уморяемост	13	76.47 (50.10÷93.12)	8	42.11 (20.25÷66.50)	6	75.00 (34.91÷96.81)	4	66.67 (22.28÷95.67)
Спонтанни кръвоизливи	14	82.35 (56.57÷96.2)	10	52.63 (28.86÷75.55)	6	75.00 (34.91÷96.81)	2	33.33 (4.33÷77.72)
Анемия на видимите лигавици	9	52.94 (27.81÷77.02)	10	52.63 (28.86÷75.55)	6	75.00 (34.91÷96.81)	2	33.33 (4.33÷77.72)
Увеличени лимфни възли	9	52.94 (27.81÷77.02)	8	42.11 (20.25÷66.50)	5	62.50 (24.49÷91.48)	2	33.33 (4.33÷77.72)
Кожни лезии	6	35.29 (14.21÷61.67)	7	36.84 (16.29÷61.64)	6	75.00 (34.91÷96.81)	2	33.33 (4.33÷77.72)
Отоци в ниските части на крайници	8	47.06 (22.98÷72.19)	6	31.58 (12.58÷56.55)	5	62.50 (24.49÷91.48)	2	33.33 (4.33÷77.72)
Очни изменения	9	52.94 (27.81÷77.02)	6	31.58 (12.58÷56.55)	5	62.50 (24.49÷91.48)	3	50.00 (11.81÷88.19)
Куцота	9	52.94 (27.81÷77.02)	5	26.32 (8.15÷51.20)	4	50.00 (15.70÷84.30)	2	33.33 (4.33÷77.72)
Повръщане	6	35.29 (14.21÷61.67)	5	26.32 (8.15÷51.20)	3	37.50 (8.52÷75.51)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Диаричен синдром	5	29.41 (10.31÷55.96)	2	10.53 (1.30÷33.14)	3	37.50 (8.52÷75.51)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Бъбречна недостатъчност	3	17.65 (3.80÷43.43)	1	5.26 (0.13÷26.03)	2	25.00 (3.19÷65.09)	0	0 (0÷45.93)
Гнойно-катарален ринит	3	17.65 (3.80÷43.43)	1	5.26 (0.13÷26.03)	2	25.00 (3.19÷65.09)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Артрит/Полиартрит	2	11.76 (1.46÷36.44)	0	0 (0÷17.65)	1	12.50 (0.00÷35.42)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Диспнея	3	17.65 (3.80÷43.43)	0	0 (0÷17.65)	1	12.50 (0.00÷35.42)	0	0 (0÷45.93)
Мелена	0	0 (0÷19.51)	0	0 (0÷17.65)	1	12.50 (0.00÷35.42)	0	0 (0÷45.93)

*ЕС - *E. canis*, **AP - *A. phagocytophilum* *** CL - confidence limit (доверителен интервал)

**Табл. 23. Честота на хематологичните отклонения при кучетата
с активна *E. canis*, *A. phagocytophilum*, ко-инфекция и с PCR (-) Ab (-)**

	активна ME PCR(+)/Ab(+) (n= 17)		активна ГА PCR(+)/Ab(+) (n= 19)		активна ко-инфекция PCR (+)/EC*Ab (+); AP**Ab (+) (n= 8)		PCR (-)/ EC Ab (-); AP Ab (-) (n= 6)	
	N	% (CL***)	N	% (CL)	N	% (CL)	N	% (CL)
Хемоглобинемия	4	23.53 (6.81÷49.90)	5	26.32 (8.15÷51.20)	3	37.50 (8.52÷75.51)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Еритропения	4	23.53 (6.81÷49.90)	9	47.37 (24.45÷71.14)	3	37.50 (8.52÷75.51)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Понижен хематокрит	4	23.53 (6.81÷49.90)	9	47.37 (24.45÷71.14)	4	50.00 (15.70÷84.30)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Тромбоцитопения	8	47.06 (22.98÷72.19)	9	47.37 (24.45÷71.14)	6	75.00 (34.91÷96.81)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Левкоцитоза	1	5.88 (0.15÷28.69)	4	21.05 (2.72÷39.328)	4	50.00 (15.70÷84.30)	5	83.33 (35.88 ÷99.58)
Лимфоцитоза	1	5.88 (0.15÷28.69)	2	10.53 (1.30÷33.14)	3	37.50 (8.52÷75.51)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Гранулоцитоза	2	11.76 (1.46÷36.44)	4	21.05 (2.72÷39.328)	4	50.00 (15.70÷84.30)	4	66.7 (22.28÷95.67)
Моноцитоза	4	23.53 (6.81÷49.90)	2	10.53 (1.30÷33.14)	2	25.00 (3.19÷65.09)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Левкопения	7	41.18 (18.44÷67.08)	7	36.84 (16.29÷61.64)	2	25.00 (3.19÷65.09)	0	0 (0÷45.93)
Лимфопения	6	35.29 (14.21÷61.67)	7	36.84 (16.29÷61.64)	3	37.50 (8.52÷75.51)	0	0 (0÷45.93)
Неутропения	7	41.18 (18.44÷67.08)	7	36.84 (16.29÷61.64)	1	12.50 (0.00÷35.42)	0	0 (0÷45.93)
Моноцитопения	1	5.88 (0.15÷28.69)	1	5.26 (0.13÷26.03)	1	12.50 (0.00÷35.42)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Еозинопения	3	17.65 (3.80÷43.43)	5	26.32 (8.15÷51.20)	1	12.50 (0.00÷35.42)	3	33.33 (4.33÷77.72)

*EC - *E. canis*, **AP - *A. phagocytophilum* *** CL - confidence limit (доверителен интервал)

**Табл. 24. Честота на биохимичните отклонения при кучетата
с активна *E. canis*, *A. phagocytophilum*, ко-инфекция и с PCR (-) Ab (-)**

	активна МЕ PCR(+)/Ab(+) (n= 17)		активна ГА PCR(+)/Ab(+) (n= 19)		активна ко-инфекция PCR (+)/EC*Ab (+); AP**Ab (+) (n= 8)		PCR (-)/EC Ab (-); AP Ab (-) (n= 6)	
	N	% (CL***)	N	% (CL)	N	% (CL)	N	% (CL)
Повишен креатинин	2	11.76 (1.46÷36.44)	1	5.26 (0.13÷26.03)	4	50.00 (15.70÷84.30)	0	0 (0÷45.93)
Повишена урея	2	11.76 (1.46÷36.44)	1	5.26 (0.13÷26.03)	4	50.00 (15.70÷84.30)	0	0 (0÷45.93)
Повишена ALAT	2	11.76 (1.46÷36.44)	3	15.79 (3.38÷39.58)	3	37.50 (8.52÷75.51)	4	66.7 (22.28÷95.67)
Повишена ASAT	5	29.41 (10.31÷55.96)	2	10.53 (1.30÷33.14)	3	37.50 (8.52÷75.51)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Повишена AP	3	17.65 (3.80÷43.43)	1	5.26 (0.13÷26.03)	3	37.50 (8.52÷75.51)	1	16.67 (0.42÷64.12)
Повишен общ белтък	1	5.88 (0.15÷28.69)	2	10.53 (1.30÷33.14)	3	37.50 (8.52÷75.51)	4	66.7 (22.28÷95.67)
Понижен албумин	0	0 (0÷19.51)	1	5.26 (0.13÷26.03)	3	37.50 (8.52÷75.51)	4	66.7 (22.28÷95.67)
Повишени глобулини	1	5.88 (0.15÷28.69)	2	10.53 (1.30÷33.14)	3	37.50 (8.52÷75.51)	4	66.7 (22.28÷95.67)

*EC - *E. canis*, **AP - *A. phagocytophilum* *** CL - confidence limit (доверителен интервал)

*** CL - confidence limit (доверителен интервал)

III. ОБСЪЖДАНЕ

Клиничната изява на моноцитната ерлихиоза при кучето се характеризира с три етапа - остър, субклиничен и хроничен. След инкубационен период от 1-2 седмици, най-често наблюдаваните клинични признаци на остро боледуване са треска, летаргия, липса на апетит или анорексия, анемия на видимите лигавици, увеличени лимфни възли, загуба на телло и мускулно-скелетна болка или дискомфорт (Mazera et al., 2010; Kane et al., 2011; Sosa-Gutierrez et al., 2013).

В обзора си „Epidemiological and Clinicopathological Features of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Dogs: A Systematic Review.“ Khatat et al., (2021) обобщавайки редица проучвания, докладват, че най-често установяваните клинични признаци при остра гранулоцитната анаплазмоза отново са треска, летаргия, анорексия и депресия.

Основните клинични признаци, които ние установихме при прегледът на насочените за диагностика кучета бяха депресия треска, анорексия, загуба на телло, лесна уморяемост, спонтанни кръвоизливи, анемия на видимите лигавици и увеличени лимфни възли.

При хематологичните изследвания най-често установените от нас отклонения бяха тромбоцитопения и еритроцитопения. Пониженият брой на червените кръвни клетки логично беше съпроводен със стойности на хемоглобина и хематокрита под референтните стойности. Под нормите бяха и MCV, MCH и MCHC. Тези находки са характерни за развиващата се микроцитна, хипохромна анемия.

При прегледа на данните за бялата кръвна картина, по-честите отклонения, които установихме включваха левкопения, лимфопения, неутропения.

Разгледани паралелно, данните от червената и бялата кръвна картина показваха наличие на панцитопения, и вероятна нерегенеративна анемия при около ¼ от кучетата. Според Parashar et al., (2016) нерегенеративната анемия, тромбоцитопенията и умерената левкопения са трите основни

хематологични отклонения следващи острата инфекция с *E. canis* или *A. phagocytophilum*. Тези състояния са описани и при хроничната форма на гранулоцитната анаплазмоза (Rungsipipat et al., 2009).

При биохимичното изследване на кръвните проби най-честите отклонения, които установихме бяха насочващи за остра бактериална инфекция. Това бяха хиперглобулинемия (26.4%) и хипергамаглобулинемия (24.5%), съпроводени с хипоалбуминемия (22.6%).

Данни за увредена функция на черния дроб ние установихме при под 20% от изследваните животни. Такива резултати обикновено се наблюдават при хронично чернодробно увреждане както по време на субклиничната, така и в хроничната фази на моноцитната ерлихиоза (Rungsipipat et al., 2009).

Инфекцията с *E. canis* при кучета в България е установена серологично през 2006, а с *A. phagocytophilum* през 2008 (Tsachev, 2006a, Tsachev et al., 2008). От тогава диагностиката в клиниките за дребни животни разчита основно на бързи тестове за установяване на антитела срещу тези причинители.

При нашето изследване чрез SNAP® 4Dx® Plus установихме антитела срещу *Ehrlichia* spp. при 81.1% от изследваните проби, срещу *Anaplasma* spp. при 35.8%, а едновременно срещу двата антигена при 22.6%. Тези резултати показват, че при тестваните животни преобладават инфекциите с представители на род *Ehrlichia*. В това отношение нашите резултати се различават от представената от Tsachev et al. (2006b) серопревалентност от 37.5% за *E. canis* в Северна България и 30% в южната част на страната (Tsachev et al., 2006c). Подобни скринингови проучвания, в последствие провеждат Pantchev et al. (2015), които при тестването на 167 проби от кучета (без насоки за векторно-преносима рикетсиоза) установяват 77 (46.1%) позитивни за *A. phagocytophilum* и 35 (21%) позитивни за *E. canis*. В същото време техните резултати за ко-инфекции *E. canis*+*A. phagocytophilum* (30 проби – 18%) са съпоставими с установените от нас

22.6% проби с наличие на антитела едновременно срещу двата патогена. Manev (2020), тества 448 бездомни кучета от различни части на град София и столичните райони. Той също установяват доминация на пробите положителни за IgG срещу анаплазми – 16.3%. Шест проби (1.3%) са били положителни за антитела срещу *Ehrlichia* spp. и само три за ко-инфекция с *Anaplasma* spp. и *Ehrlichia* spp. По-ниски от нашите са данните на Arnaudov (2021) за 30.4% позитивни за антитела срещу *E. canis* и съответно 26.1% срещу *A. phagocytophilum*. Последните три проучвания обхващат животни без клинични или хематологични индикации за векторно-преносима рикетсиоза, което обяснява по-ниската серопревалентност и повечето положителни проби за антитела срещу *A. phagocytophilum*. Характерната за гранулоцитна анаплазмоза висока серопревалентност и относително нисък брой клинично болни кучета може да обясни разликите в резултатите при тестване на съмнително заразени и клинично здрави кучета (Foley et al., 2001; Kohn et al., 2008; Bowman et al., 2009).

Данни, подобни на нашите, за по-чести серологично положителни тестове за *E. canis* в сравнение с тези за *A. phagocytophilum* представя Valentina Ebani (2019) при анализа на резултатите от серологични изследвания на кучета в различни части на Италия в периода 2013-2017г. установява, че *E. canis* е най-широко разпространеният патоген, пренасян от кърлежи, със серопревалентност от 16.2%, докато за *A. phagocytophilum* е значително по-ниска със средна стойност от 3.3% (Ebani, 2019).

За доминиране на серопозитивните по отношение на *Anaplasma* spp. са представени съобщения от няколко съседни на България страни като Сърбия (Bogićević et al., 2017; Filipović et al., 2018), Хърватия (Mrljak et al., 2017) и Румъния (Mircean et al., 2012).

❖ При нашето **IFA изследване**, обаче повечето положителни проби бяха с титри 1:40 или 1:80. Подобни на нашите резултати от серологично проучване чрез IFA представя Ebani (2019), която обобщава данни за Централна Италия в периода 2013-2017г. Авторката установява, че

60% от позитивните проби са с титър до 1:80 за *E. canis*. За *A. phagocytophilum* 40% от тестваните серуми са били с титър до 1:80 (Ebani, 2019).

Документирано е прогресивно увеличение на IFA тестовите титри при естествени и експериментални инфекции с *E. canis*, през първите 5 месеца след заразяването, което предполага непрекъснато антигенно стимулиране. В унисон с това са и резултатите ни за високите титри установени (над 1:160) при 13 кучета срещу *E. canis* и при 10 срещу *A. phagocytophilum*.

❖ При тестването на пробите с **лабораторни ELISA китове** Anti-*E. canis* ELISA Dog (IgG) и Anti-*Anaplasma phagocytophilum* ELISA Dog (IgG) (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Luebeck, Germany) отново по-висока беше серопревалентността по отношение на *E. canis* - 77.4%, резултат идентичен с полученият от SNAP® 4Dx® Plus. За *A. phagocytophilum* положителни бяха 40.6%. Ко-инфекция установихме при 29.3% от пробите.

Използваните в нашето изследване ELISA тестове са с висока чувствителност и специфичност. Това се потвърждава от високия процент на съвпадение между тях и IFA. Ние установихме над 95% съвпадение на резултатите за *Ehrlichia* spp. и *Anaplasma* spp. за SNAP® 4Dx® Plus и IFA. Този процент беше по-нисък при лабораторният ELISA тест и IFA съответно 87%. Подобни данни представят при сравнителен анализ на три ELISA теста и IFA Harrus et al., (2002). Тези автори установяват положителна и значима корелация между резултатите от трите теста и стандарта IFA. Те установяват, че 16 от 17 несъответствия между различните тестове са в по-ниските титри ($\leq 1:320$). Това подкрепя становището, че чувствителността е по-ниска в долния диапазон на титрите на антитела, но висока при титри над 1:320. Подобна корелация установяват и O'Connor et al. (2006) за проби с титър на антитела по IFA над 1:160.

Когато сравнихме данните от двата ELISA теста установихме 16 проби с различен резултат за антитела срещу *E. canis*. При 6 SNAP 4Dx Plus беше отрицателен, а Anti-*E. canis* ELISA Dog (IgG) положителен. При всички тях екстинкциония коефициент определен чрез EUROIMMUN ELISA беше между 1.2 и 1.4, което предполага относително нисък титър на антитела. Сходни данни предствят Harrus et al. (2002) при сравнението на индиректна rMAP2 ELISA, dot-ELISA (Immunocomb® Biogal, Israel) и Snap® 3Dx, особено при ниски титри на антитела. При подобно изследване Bélanger et al. (2002) също установяват малко по-висока чувствителност на индиректна ELISA, в сравнение със SNAP тест, отново при ниски титри на анти-*E. canis* антитела. Изводите на двата колектива подкрепят мнението, че ELISA тестове с количествено определяне на антителата, позволяват да се откриват остро заразените животни, чрез доказване на сероконверсия, тъй като клинично болните кучета развиват високи титри в рамките на няколко седмици след заразяването (Harrus et al., 1998).

Сравняването на резултатите за анти-*A. phagocytophilum* антитела показва подобна (78.3%) идентичност. От 23 серума с различие в резултатите, 14 бяха с отрицателен SNAP® 4Dx® Plus и положителен Anti-*A. phagocytophilum* ELISA Dog (IgG). Дванадесет от тези 14 проби бяха едновременно положителни за Anti-*E. canis* антитела и по двата теста. При всички тези проби екстинкциония коефициент за *E. canis* беше много по-висок от този за *A. phagocytophilum*. Това ни позволява да направим предположение, че вероятно се касае за кръстосана реакция на Anti-*A. phagocytophilum* ELISA Dog (IgG) теста. Подкрепя на това наше твърдение са и много високите екстинкционии коефициенти за Anti-*E. canis*, антитела които надвишаваха 3.0. Подобно твърдение изказват и Solano-Gallego et al. (2006), които предполагат кръстосани реакции между *E. canis* и *A. phagocytophilum*, когато антитела срещу един от патогените присъстват при много високи титри (Waner et al., 2001).

PCR изследвания

Въпреки че инфекции с *A. phagocytophilum* и *E. canis* бяха индиректно потвърдени в предишни серологични изследвания на клинично болни и здрави кучета (Tsachev, 2006; Tsachev et al., 2008, Pantchev et al., 2015; Manev, 2020; Arnaudov, 2021), прякото им откриване чрез молекулярно-диагностични методи никога не е извършвано в България. По този начин, настоящото проучване е първото PCR изследване, което доказва наличието на активни инфекции с *E. canis*, *A. phagocytophilum* и *A. platys* при кучета, проявяващи клинични признаци на заболяванията. Конвенционалният PCR протокол, който използвахме включваше начална амплификация, използвайки набор от специфични за сем. *Anaplasmataceae* праймери, последвана на втори етап с праймери специфични за 409 bp фрагмента от 16S *rRNA* гена на *E. canis*, 444 bp фрагмента от *ankA* гена на *A. phagocytophilum* и 678 bp фрагмента от 16S *rRNA* гена на *A. platys* (Inokuma et al., 2000; Caturegli et al., 2000; Parola et al., 2000; Walls et al., 2000).

Остра форма на ME *E. canis*. На база на молекулярните изследвания, допълнени със серологичните, установихме, че при **17 пациенти** е налице **остра ME *E. canis* - 15 PCR(+)/Ab(+) и 2 PCR(+)/Ab(-)**. Естествено е при острата форма да откриваме **PCR(+)/Ab(+)** защото антителата започват да се образуват още преди появата на клиничните признаци, но синтеза им продължава докато патогена е наличен в организма. При експериментални инфекции, IgM и IgA антителата се появяват около 4-7 дни след инфектирането с ерлихии, а IgG антителата се откриват 8 дни след заразяването с титри 1:160 и 1:640 /IFA/ (Waner, et al., 1996; Waner, et al., 2014). При **PCR(+)/Ab(-)** може да се допусне хипотезата, че заболяването е в самото начало и IgG антителата все още са с минимален титър, недостатъчен за позитивирането на серологичния тест. В тази връзка бихме препоръчали при пациенти с негативен първоначален серологичен тест, да се извърши повторно изследване, особено при установяване на насочваща клинична картина и динамика на болестния процес.

❖ **Остра инфекция/форма на ГА *A. phagocytophilum*** бе установена при **19 пациенти** - (18 PCR(+)/Ab(+) и 1 PCR(+)/Ab(-). При пациента с **PCR(+)/Ab(-)** считаме, че резултатът може да се дължи на начален етап в който е заболяването и IgG антителата все още са с минимален титър.

❖ **Остра ко-инфекция/форма МЕ/ГА PCR(+)/Ab(+)** едновременно за ***E. canis/A. phagocytophilum*** бе установена при 8 пациенти.

Нашите резултати от идентифициране на специфична за вида 16S rRNA последователност за *E. canis* при кучета чрез PCR-анализ бяха около два пъти по-ниски от тези, докладвани от Елена Петров (2018) в Република Северна Македония, съседна на България страна. Авторката установява наличие на 16S rRNA последователност за *E. canis* при 45% от изследваните кучета. В нейното изследване, както и в нашето, са включени и животни с клинични, хематологични и серологични данни за моноцитна ерлихиоза. Разликите в резултатите между нашите проучвания и изследванията на Е. Петров могат да се обяснят с честотата на инвазията с кърлежи в страната, мерките, предприети от собствениците за защита на кучетата от ектопаразити, третиране с тетрациклини при предишни диагностицирани инфекции с някои от патогените или подбора на животните включени в проучванията.

В едно проучване на настанени в приюти, наскоро заловени улични и ловни кучета Filipović et al. (2018) установяват серопревлентност от 28.8% по отношение на *Anaplasma* spp., но с отрицателен PCR. Авторите предполагат, че кучетата в Сърбия, друга съседна на България страна, се заразяват с *A. phagocytophilum*, но се освобождават от причинителя. В нашето изследване бяха включени животни с данни за остри инфекции, при което е логично и процента на PCR положителните да е висок, докато Filipović et al. (2018) изследват животни без клинични и хематологични данни за заболяването, изложени на риск да бъдат заразени.

При изследване на 400 кръвни проби от кучета в европейската част на Турция, трета страна, съседна на България, Çetinkaya et al. (2016) установяват, че от 109 серопозитивни проби, 24 са PCR положителни за *E. canis*, 16 за *A. phagocytophilum*. При 12 проби е открит геном на повече от един патоген. Изследователите съобщават за 22% корелация между положителните серологични и PCR резултати за *E. canis*, 15% за *A. phagocytophilum*. Тези данни са много сходни с нашите резултати по отношение на етиологичния агент на моноцитната ерлихиоза, заболяване, при което се наблюдават както хронична фаза, така и дълготрайно носителство. В същото време те се различават значително при другите рикетсии, което вероятно се дължи на селекцията на пробите.

Въпреки, че България е страна с умерено континентален климат, у нас през голяма част от годината температурните условия са подходящи за повишена активност на различните кърлежи пренасящи *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *A. platys*. В тази връзка получените от нас резултати от PCR тестовете са много сходни с редица изследвания в тропични и субтропични райони (Maazi et. al., 2014; Mittal et al., 2017; Malik et al., 2018 Lara et. al., 2020). Получените от нас резултати, близки до докладите от топли и влажни райони подсказват опасността климатичните промени, свързани с покачването на температурите в световен мащаб да позволяват разширяване ареалите на различни видове кърлежи и до повишаване тяхната активност, с което риска за заразяване с векторно-предавани рикетсии прогресивно да расте в страните с умерен климат.

❖ **Остра форма на ЦТ *A. platys* /PCR(+)/Ab(+)** установихме при един пациент за първи път в България. Клиничните признаци, който той показваше включваха: летаргия, треска, загуба на тегло, лесна уморяемост, спонтанни кръвоизливи, кожни лезии, отоци в ниските части на крайниците. Установени бяха и следните хематологични промени: тромбоцитопения, левкоцитоза, еритропения, неутрофилия, хемоглобинемия и понижен хематокрит. При този пациент наблюдавахме и

отклонения в биохимичните показатели - повишен ASAT, повишена урея, увеличаване на общия белтък и повишена глобулинова фракция, с понижени нива на албумините.

❖ **Остра ко-инфекция МЕ/ГА/ЦТ PCR(+)/Ab(+)** едновременно за *E. canis*/*A. phagocytophilum*/*A. platys* бе установена при 1 пациент.

Въпреки че досега не са публикувани данни, доказването на *A. platys* в България не е изненадващо. Този патоген беше установен в редица средиземноморски страни (Rymaszewska & Grenda 2008; René-Martellet et al., 2015). Инфекцията с *A. platys* беше потвърдена и в няколко държави от балканския полуостров – Гърция (Kontos et al., 1991), Румъния (Andersson et al. 2013; 2018), Хърватия (Dyachenko et al. 2012), Сърбия (Ilić Božović 2021) и европейската част на Турция (Çetinkaya et al., 2016). При всички тези изследвания процента на PCR положителните проби е нисък - от 2 до 8%, което съвпада с установеното и от нас.

❖ **PCR (-) Ab(+)** *E. canis* резултат е установен при **60** кучета с клиника. Допускаме, че повечето от тези пациенти са с **хронична МЕ *E. canis***, но не може в никакъв случай да се изключи и възможността тези антитела да са от прекарана предишна инфекция. Известно е, че тези анти-ерлихийни антитела могат понякога да перзистират за и повече от една година и да бъдат установени в кръвта на преболедувалите животни (Sainz, Á et al, 2015).

PCR е директен метод за откриване на ДНК на инфекциозните агенти. Въпреки това, откриваемо количество антиген или ДНК трябва да присъства в изследваната проба (Hernández et al., 2015), което означава, че отрицателния резултат от теста не изключва непременно наличието на инфекция. Докато в острата фаза на заболяването, *E. canis* лесно се открива в кръвта, то в субклиничните и хроничните фази има възможност за фалшиви отрицателни резултати при изследването само на кръвни проби (Rodríguez-Alarcón et al., 2020).

❖ ***A. phagocytophilum* PCR (-) Ab(+)** резултат е установен само при 10 кучета с клиника. В тези случаи не можем да говорим за хронична форма на заболяването защото е известно, че такава няма или е поставена под въпрос (Sainz, Á et al., 2015). Според нас е много вероятно, клиничните признаци да не се отнасят за анаплазмоза, а антителата да са от предишна явна или субклинична инфекция.

❖ **PCR (-)/EC Ab(-); AP Ab(-)** бе установено при 6 пациента. При тях регистрираните клинични признаци даваха основание за включване в съмнителните за векторно-преносими заболявания пациенти. Хематологичните им показатели също бяха характерни за остро протичащ възпалителен процес. Още повече, че и биохимичните изследвания на кръвта подкрепяха последната теза - повишаване на общия белтък и глобулиновата фракция, с понижени нива на албумини. Въпреки това, негативните PCR и серологични тестове отхвърлят наличието на рикетсиозно заразяване. В тази връзка напълно се присъединяваме към известната теза, че само клиничните признаци и хематологичните промени са достатъчно надеждни за поставяне на крайна дефинитивна диагноза (Цачев, 2009, 2010).

На базата на посочените резултати и дискусия можем да констатираме и посочим следните съображения: От включените в изследването 106 клинични пациенти със съмнение за векторни инфекции:

- при 46 (43%) от тях доказваме остра форма на МЕ, ГА, ЦТ и коинфекции.

- при 6 (6%) от тях нямаме серологични и молекулярни доказателства за МЕ, ГА, ЦТ и коинфекции.

- при останалите 54 (51%) не можем да бъдем категорични в крайната дифинитивна диагноза.

Апробираните от нас протоколи за конвенционален PCR, позволяват доказване наличието на таргетните патогени чрез молекулярен анализ при кучета. Те лесно може да се адаптират за диагностични изследвания и при хора, както и скрининг за *A. phagocytophilum*, *A. platys* и *E. canis* при кърлежи, с което да се подпомогне диагностиката на тези потенциални зоонози.

IV. ИЗВОДИ

1. За точна диагностика на моноцитната ерлихиоза, гранулоцитната анаплазмоза и цикличната тромбоцитопения при кучетата, клиничната картина задължително трябва да бъде подкрепена от параклинични, серологични и молекулярно-генетични изследвания.
2. Съответствието между резултатите от IFA и SNAP® 4Dx® е почти пълно, както показва Cohen's k, а процентът на съвпадение надвишава 95% за *E. canis* и *A. phagocytophilum*.
3. Съответствието между резултатите от IFA и и Euroimmune ELISA е значимо, както показва Cohen's k, а процентът на съвпадение надвишава 85% за *A. phagocytophilum* и е умерено по отношение резултатите за *E. canis*.
4. Остра форма на протичане на МЕ, ГА, ЦТ или ко-инфекции между тях се доказва при по-малко от 50% (46) от кучетата включени в изследването с клинична картина за векторно-преносимо заболяване.
5. Поради отрицателният PCR тест, диагноза МЕ, или ГА, или ЦТ или ко-инфекции между тях не може категорично да бъде поставена при 51% (54) от кучетата включени в изследването с клинична картина за векторно-преносимо заболяване и положителен серологичен резултат.
6. Независимо от клинична картина насочваща векторно-преносимо заболяване, поради отрицателния резултат от серологичните и молекулярно-генетичното изследване не може да се потвърдени инфекция с *E. canis*, *A. phagocytophilum* или *A. platys* при 6 от кучетата включени в изследването.
7. Спонтанните кръвоизливи са най-често клиничен признак, като се установяваният при $\frac{3}{4}$ от PCR(+)/Ab(+) за *E. canis* и $\frac{2}{3}$ PCR(+)/Ab(+) за *E. canis/A. phagocytophilum*.
8. Очни изменения са регистрирани над 52% при кучета с PCR(+)/Ab(+) за *E. canis* и над 62% /или PCR(+)/Ab(+) едновременно за *E. canis/A. phagocytophilum* и само при 30% от животните с моно *A. phagocytophilum* инфекция
9. Най-честите хематологични промени установени при кучетата с доказана МЕ, или ГА, или ЦТ или ко-инфекции са тромбоцитопения, лека до умерена анемия, левкопения и неутропения.
10. При кучетата с ко-инфекция много по-често се наблюдават промени в биохимичните показатели отколкото при тези с моно *E. canis* или *A. phagocytophilum*.

V. ПРИНОСИ

- За първи път в България чрез молекулярно-генетични методи е доказана ДНК на *E. canis* в кръвни проби от кучета – *оригинален принос*.
- За първи път в България чрез молекулярно-генетични методи е доказана ДНК на *A. phagocytophilum* в кръвни проби от кучета – *оригинален принос*.
- За първи път в България е доказано заболяването циклична тромбоцитопения при куче – *оригинален принос*.
- Потвърдено е, че установяването на клиничните признаци и хематологичните промени описани при МЕ, или ГА, или ЦТ или ко-инфекции не са достатъчно основание за поставяне на диагноза, дори при положителен серологичен резултат без етиологично изследване за съответния причинител – *потвърдителен принос*

VI. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. Преди започване на лечение при животни с клинични признаци и хематологични промени характерни за векорните инфекции МЕ или ГА да бъде проведено серологично и молекулярно изследване за тях.
2. При отсъствие на положителен резултат от терапията с доксициклин при пациенти с МЕ, ГА и ЦТ да бъдат потърсени за консултации специалисти от секцията по Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна медицина към ВМФ на ТрУ в Стара Загора.
3. Поради нарастващото разпространение на векторно предаваните рикетсиози има необходимост от провеждане на семинари за обучение на ветеринарни лекари от страната за тяхната диагностика и терапия.
4. Към секцията по Епидемиология, инфекциозни болести и превантивна медицина към ВМФ на ТрУ в Стара Загора да бъде изградена лаборатория за молекулярно-диагностични изследвания на векторно-предаваните, вкл. зоонозните заболявания при кучетата.

VII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Gospodinova Kr.**, Zhelev, G., & Petrov, V. (2019). Comparison of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay test with an indirect immunofluorescent antibody test in diagnosing ehrlichia and anaplasma infections in dogs. *Trakia Journal of Sciences*, 17 (4), 346-352. ISSN 1313-7050 (print), ISSN 1313-3551 (online) doi:10.15547/tjs.2019.04.009.
2. **Gospodinova, K.**, Koev, K., & Petrov, V. (2022) Performance of laboratory ELISA and rapid ELISA tests for *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. antibody detection in dogs. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 25(4), 658-664. ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2439.
3. **Gospodinova, K.**, Stanilov, I., Miteva, L., Tsachev, I. & Petrov V. (2023) Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in blood samples from dogs in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, Online First, ISSN 1311-1477; DOI: 10.15547/bjvm.2023-0003

Участия в научни форуми във връзка с дисертацията

1. XXI SYMPOSIUM OF EPIZOOTIOLOGIST AND EPIDEMIOLOGIST (XXI EPIZOOTIOLOGY DAYS), Novi Sad 08-10 April 2019
Gospodinova Kr., G. Zhelev, V. Petrov. 2019. Comparison of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay test with an indirect immunofluorescent antibody test in diagnosing ehrlichia and anaplasma infections in dogs.
2. ТРЕТА МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ „ВЕТЕРИНАРНАТА МЕДИЦИНА В ПОЛЗА НА ХОРАТА“, Стара Загора 22-23.10.2021г.
Gospodinova K., Koev K. & Petrov V. Comparative evaluation of laboratory ELISA and rapid ELISA tests for *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* antibody detection in dogs
3. МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ “ONE HEALTH” – 12 МАЙ 2023, СТАРА ЗАГОРА
Gospodinova, K., I. Stanilov, L. Miteva, Il. Tsachev & Vl. Petrov. Molecular genetic investigations on infections with *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys*.

Участие в университетски научни проекти във връзка с дисертацията

Научен проект № 9/2020 „Молекулярно-генетични изследвания върху разпространението на инфекции с *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum* и *Anaplasma platys* при кучета”.

VIII. РЕЗЮМЕ

Болестите, пренасяни от кърлежи, са важни нововъзникващи заболявания в световен мащаб при хора и животни и имат важно зоонозно значение.

За Европа основните заболявания от тази група са моноцитната ерлихиоза (МЕ), гранулоцитната анаплазмоза (ГА) и цикличната тромбоцитопения (ЦТ). Те се причиняват от *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* и *Anaplasma platys*, които са облигатни, грам негативни интрацелуларни бактерии принадлежащи към сем. *Anaplasmataceae*. Проучванията върху наличието и разпространението на тези заболявания в България започват в началото на 21-ви век. Въпреки това досега липсват изследвания, потвърждаващи/отхвърлящи активна инфекция чрез доказване геном на етиологичните агенти при серопозитивни кучета с клинични признаци и хематологични отклонения описани при МЕ, ГА и ЦТ.

Чрез настоящето изследване си поставихме за цел да се извършат диагностични проучвания чрез клинични, хематологични, биохимични, серологични и молекулярно-генетични изследвания, като се анализират данните от тях при съмнителни/потвърдени пациенти за моноцитна ерлихиоза, гранулоцитна анаплазмоза, циклична тромбоцитопения, вкл. и при протичането им като ко-инфекции при кучета в България.

В нашето проучване бяха включени 106 кучета, пациенти на клиниката за дребни животни към Университетската болница на Тракийския университет в Стара Загора. Всички те бяха с данни за предходни инвазии с кърлежи и клинични признаци, хематологични биохимични промени, характерни за заболяванията.

Всички 106 кучета бяха тествани серологично със SNAP® 4Dx® тест, индиректна имунофлуоресценция („златен стандарт“) и EUROIMMUN ELISA Kit. Тези методи разкриват антитела срещу патогена, но чрез тях не е възможно да се направи разлика между контакт в миналото и активна инфекция при еднократно изследване на пациентите. Затова използвахме и конвенционален PCR като директен метод за откриване на ДНК на инфекциозните агенти в кръвни проби.

За целта бяха разработени 4 PCR протокола за доказване на:

- 345 bp фрагмента от рибозомалния ген *16S rRNA* от ДНК на рикетсиите от сем. *Anaplasmataceae*;
- 409 bp фрагмента от *16S rRNA* гена на *E. canis*;
- 444 bp фрагмента от *ank A* гена на *A. phagocytophilum*;
- 678 bp фрагмента на *16S rRNA* гена на *A. platys*.

Всички получени резултати бяха статистически анализирани чрез определяне на доверителни интервали, процент на съответствие и индекс Cohen's Kappa.

При сравняването на серологичните данни установихме почти пълно съответствие на положителните резултати за антитела срещу *A. phagocytophilum* и *E. canis* за SNAP® 4Dx® тест/индиректна имунофлуоресценция. Малко по-ниски бяха процента на съвпадение и Cohen's k при сравняване на IFA и EUROIMMUN ELISA Kit от една страна и SNAP® 4Dx® Plus и EUROIMMUN ELISA Kit.

На база резултатите PCR и серологичните изследвания бяха формирани 5 групи пациенти с активна инфекция.

Три от групите включваха животни с активна моноинфекция *E. canis* или *A. phagocytophilum* и активна коинфекция.

- 17 пациенти с активна *E. canis* инфекция- 15 PCR(+)/Ab(+) и 2 PCR(+)/Ab(-)

- 19 пациенти с активна *A. phagocytophilum* инфекция - 18 PCR(+)/Ab(+) и 1 PCR(+)/Ab(-)

- 8 пациенти с активна ко-инфекция *A. phagocytophilum/E. canis* PCR(+)/Ab(+)

В другите 2 групи попаднаха пациенти, при които за първи път в България бе доказана ДНК на *A. platys* като моно- и ко-инфекция.

За по-ясно отчитане и интерпретиране на останалите получените резултати, бяха формирани и още 3 групи, включващи PCR негативните животни.

От тях 2 групи бяха такива с доказани антитела в кръвта само срещу *A. phagocytophilum* (6 кучета) или *E. canis* (56 кучета) или едновременно срещу двата етиологични агента (8 кучета).

Последната група пациенти включваше 6 животни с PCR (-) резултат както и с отсъствието на антитела в кръвта.

Настоящото проучване подчертава ограниченията в диагностиката на заболявания, свързани с представители на с. *Anaplasmataceae* чрез един метод и подкрепя необходимостта от последователното използването на извънлабораторни и лабораторни инструменти за откриване на активните инфекции с тези патогени.

VIII.ABSTRACT

Tick-borne diseases are important emerging diseases worldwide in humans and animals. For Europe, the main diseases of this group are Canine Monocytic Ehrlichiosis, Canine Granulocytic Anaplasmosis and Canine Cyclic Thrombocytopenia. They are caused by *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Anaplasma platys*, obligate, gram-negative intracellular bacteria belonging to the family *Anaplasmataceae*.

The aim of the study was to perform diagnostic studies by clinical, hematological, biochemical, serological and molecular genetic investigations, analyzing their data in patients with monocytic ehrlichiosis, canine granulocytic anaplasmosis, canine cyclic thrombocytopenia including their occurrence as co-infections in dogs in Bulgaria.

One hundred and six dogs with data on tick infestations and clinical signs, hematological and biochemical changes were included. They were serologically tested for the presence of antibodies to the causative agents of diseases.

Four protocols for conventional PCR were used to detect the family *Anaplasmataceae*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* and *A. platys*.

We found almost complete correspondence of positive results for antibodies to *A. phagocytophilum* and *E. canis* from the SNAP® 4Dx® Test and IFA. The Cohen's k index was lower when comparing IFA and EUROIMMUN ELISA Kit results, as well as those of SNAP® 4Dx® Plus Test and EUROIMMUN ELISA Kit.

Five groups of patients with active infection were formed by analyzing the results of the PCR and serological investigations. Three of the groups included animals with active monoinfection with *E. canis* or *A. phagocytophilum* and co-infection - 17 with active *E. canis* infection - 15 PCR(+)/Ab(+) and 2 PCR(+)/Ab(-); - 19 with active *A. phagocytophilum* infection - 18 PCR(+)/Ab(+) and 1 PCR(+)/Ab(-); - 8 with active co-infection *A. phagocytophilum/E. canis* PCR(+)/Ab(+). The other 2 groups included patients in whom *A. platys* DNA was proven for the first time in Bulgaria as mono- and co-infection.

Other three groups included the PCR negative animals - 2 groups were those with proven antibodies in the blood to *A. phagocytophilum* (6 dogs) or *E. canis* (56 dogs) only or to both etiological agents simultaneously (8 dogs).

The last group of patients included 6 animals with a PCR (-) results as well as with the absence of antibodies in the blood.

The present study highlights the limitations in the diagnosis of diseases associated with members of the family *Anaplasmataceae* by a single method. It supports the need for consistent use of non-laboratory and laboratory tools to detect active infections with these pathogens.