

Beata Dzięgiel, Łukasz Adaszek, Stanisław Winiarczyk

WILD ANIMALS AS RESERVOIRS OF *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* FOR HUMANS

ZWIERZĘTA DZIKO ŻYJĄCE JAKO REZERWUAR *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* DLA CZŁOWIEKA

University of Life Sciences in Lublin, Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych

ABSTRACT

Anaplasma phagocytophilum is a tick-transmitted obligate-intracellular gram-negative bacteria that causes emerging human zoonosis. *A. phagocytophilum* is transmitted by Ixodid ticks. Recent studies suggest that wild animals may be reservoirs of *A. phagocytophilum* for humans. The organism infects and survives within neutrophils. The infection diagnosis is based on the detection of morulae within granulocytes of peripheral blood, results of serological tests and detection of the DNA of *A. phagocytophilum* using specific polymerase chain reaction assays (PCR).

A. phagocytophilum in most cases is transmitted to people by tick bites, but sometimes direct contact with infected blood may cause human granulocytic anaplasmosis (HGA). The possibility of infection should be taken into consideration at each occurrence of heavy disease symptoms after people come into contact with ticks.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, human granulocytic anaplasmosis (HGA), wild animals

STRESZCZENIE

Anaplasma phagocytophilum jest patogenem przenoszonym przez kleszcze z rodzaju *Ixodes* spp. i powodującym u ludzi anaplazmozę granulocytarną – HGA (ang. *Human Granulocytic Anaplasmosis*). Najnowsze badania wskazują, że głównym rezerwuarem *A. phagocytophilum* dla człowieka są zwierzęta dziko żyjące. Riketsje atakują i utrzymują się w neutrofilach. Rozpoznanie zakażenia opiera się na wykryciu moruli w granulocytach krwi obwodowej, wynikach badań serologicznych i wykryciu DNA *A. phagocytophilum* przy zastosowaniu specyficznej łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Choroba szerzy się głównie za pośrednictwem kleszczy, jednak w przypadku HGA należy zwrócić uwagę na możliwości jej szerzenia się w następstwie bezpośredniego kontaktu z krwią osobników zawierającą riketsje.

Zakażenia *A. phagocytophilum* należy rozważyć w każdym przypadku, po stwierdzeniu u pacjentów mających w przeszłości kontakt z kleszczami objawów chorobowych.

Słowa kluczowe: *Anaplasma phagocytophilum*, anaplazmoza granulocytarna (HGA), zwierzęta dziko żyjące

INTRODUCTION

Anaplasma phagocytophilum is an aetiologic factor in granulocytic anaplasmosis – a transmissible, multiple-organ disease of humans and animals (1). *A. phagocytophilum* is classified in the genus *Anaplasma*, family *Anaplasmataceae*, order *Rickettsiales*. On the

WSTĘP

Riketsje *Anaplasma phagocytophilum* są czynnikiem etiologicznym anaplazmozy granulocytarnej - transmisyjnej, wielonarządowej choroby ludzi i zwierząt (1). Klasyfikuje się je w obrębie rodzaju *Anaplasma*, w rodzinie *Anaplasmataceae*, rzędzie *Rickettsiales*. Na podstawie

basis of molecular tests, pathogens earlier considered to be separate species – *E. phagocytophila*, *E. equi* and the human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent – were included in the *A. phagocytophilum* species (1, 2). *Anaplasmataceae* are gram-negative cocci with a diameter of 0.2-2.0 μm and no ability to move. They are obligate aerobes, unable to conduct glycolysis, residing inside the cells of the infected organism. All species of the *Anaplasma* genus residing in the blood cells of mammals are surrounded by vacuoles. Target cells for *A. phagocytophilum* are neutrophils. In rare cases, *Rickettsia* can be observed in eosinophils (3).

A. phagocytophilum exhibits relatively high genetic diversity, which is reflected in the different virulence of individual *Rickettsia* strains and their tropism to various host species. The studies on the genetics of *A. phagocytophilum* have included an analysis of such microbial genes as 16S rRNA, msp4, groEL, msp2/p44 and the ankA group (4).

The newly identified strain of microorganisms – Ap-ha, whose reservoir is white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) – shows pathogenicity for humans, mice and cattle (5). Such pathogenicity is not present in the microbes of the Ap-variant 1, which can only cause disease in deer and sheep (5, 6).

As a result of these observations, four ecotypes were differentiated within *A. phagocytophilum*. Ecotype I has an affinity to the largest number of hosts (pets, deer, wild boars, hedgehogs). To date, all cases of granulocytic anaplasmosis in humans were caused by this group of *Rickettsia*. Microorganisms qualified as ecotype II were isolated from deer and rodents, and only from wild rodents for those belonging to ecotype III. Ecotype IV also includes *A. phagocytophilum* isolated from birds (7).

Our studies conducted on *A. phagocytophilum* have shown that only one genotype of *Rickettsia* is present in Poland and occurs in the organisms of pets, livestock and wild animals (8, 9).

The purpose of this article is to draw attention to wild animals as reservoirs of *A. phagocytophilum* and thus potential sources of the disease for humans.

EPIDEMIOLOGY

The *A. phagocytophilum* pathogen is widespread in the world. It can infect many species of animals, both invertebrate and vertebrate, as well as humans (10). The disease was recorded in 42 countries in Europe, Asia, the Americas and Africa (10).

wyników badań molekularnych do gatunku *A. phagocytophilum* zaliczono patogeny uważane wcześniej za odrębne gatunki: *E. phagocytophila*, *E. equi* i czynnik HGE (ang. *Human Granulocytic Ehrlichiosis agent - HGE agent*) (1,2). Przedstawiciele *Anaplasmataceae* to gram ujemne ziarniaki o średnicy 0,2-2,0 μm niewykazujące zdolności ruchu. Są one obligatoryjnymi tlenowcami, niezdolnymi do przeprowadzania glikolizy, umiejscawiającymi się w zakażonym organizmie we wnętrzu komórek. Wszystkie gatunki rodzaju *Anaplasma* w komórkach krwi ssaków otoczone są błonami formującymi wodniczki. Komórkami docelowymi dla *A. phagocytophilum* są granulocyty obojętnochłonne. W rzadkich przypadkach riketsje można zaobserwować w eozynofilach (3).

A. phagocytophilum wykazuje dość duże zróżnicowanie genetyczne, co ma swoje odbicie w odmiennej zjadliwości poszczególnych szczepów riketsji i ich tropizmie do różnych gatunków gospodarzy. Dotychczasowe badania nad genetyką *A. phagocytophilum* obejmowały analizę takich genów drobnoustrojów jak: 16S rRNA, msp4, groEL, msp2/p44, i grupy ankA (4).

Nowo zidentyfikowany szczep drobnoustrojów - Ap-ha, którego rezerwuaria stanowią myszaki białostope (*Peromyscus leucopus*), wykazuje chorobotwórczość dla ludzi, myszy i bydła (5). Zjadliwości takiej nie wykazują natomiast drobnoustroje zaliczane do wariantu Ap-variant 1, które chorobę wywołać mogą jedynie u jeleniowatych i owiec (5,6).

W efekcie wszystkich tych obserwacji, w obrębie *A. phagocytophilum* wyodrębniono cztery ekotypy. Ekotyp I wykazuje powinowactwo do największej liczby gospodarzy (zwierzęta towarzyszące, jeleniowate, dziki, jeże). Do tej pory wszystkie przypadki anaplazmozy granulocytarnej u ludzi wywołane były właśnie przez riketsje tej grupy. Drobnoustroje zakwalifikowane do ekotypu II izolowano od jeleniowatych i gryzoni, zaś należące do ekotypu III tylko od dzikich gryzoni. W obrębie ekotypu IV zlokalizowano *A. phagocytophilum* izolowane od ptaków (7).

Dotychczasowe badania własne prowadzone nad *A. phagocytophilum* wykazały występowanie w Polsce tylko jednego genotypu tych riketsji występującego zarówno w organizmie zwierząt domowych, gospodarskich, jak i dziko żyjących (8,9).

Celem niniejszego artykułu było zwrócenie uwagi na zwierzęta dziko żyjące jako rezerwuaria *A. phagocytophilum* i potencjalne źródło choroby dla ludzi.

EPIDEMIOLOGIA CHOROBY

A. phagocytophilum jest patogenem szeroko rozpowszechnionym na świecie. Drobnoustroje mogą zakażać liczne gatunki zwierząt, zarówno bezkręgowych, jak i kręgowców, a także ludzi (10). Chorobę notowano w 42 krajach, w Europie, Azji, obu Amerykach i Afryce (10).

In the United States, in the areas where granulocytic anaplasmosis is endemic (states of Wisconsin and New York), the presence of antibodies to *Rickettsia* was demonstrated in the serum of 15-36% of people. In Europe, this percentage ranges from 1 to 20% (11).

Depending on the continent, the following ticks are vectors for *A. phagocytophilum*: *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp., and *Haemophysalis* spp. The main vector for *Rickettsia* in Europe is *Ixodes ricinus* (8). Rickettsial infection is possible only when infected ticks feed on the body of a susceptible individual for at least 4-24 hours (12). Cases of granulocytic anaplasmosis occur mostly in spring and autumn – the seasons of tick activity. In the areas where anaplasmosis is endemic, it can be accompanied by other tick-borne diseases, like borreliosis and babesiosis (8, 13).

In the tick population, *A. phagocytophilum* is transmitted only transstadially. Therefore, in order for the arachnids to be infected, a reservoir of *Rickettsia*, such as domestic or wild animals, must be present in their environment (2, 14).

WILD ANIMALS AS RESERVOIRS OF *A. PHAGOCYTOPHILUM*

The main reservoir of *A. phagocytophilum* in nature are forest rodents and game of the deer family. Research conducted by Bown et al. (13) in the United Kingdom showed that the period of bacteremia in rodents was short and lasted several weeks, and that the highest frequency of infections with *A. phagocytophilum* was recorded in late summer and autumn. The presence of these microbes in rodents was more often observed in spleen samples than in the blood. This is due to the fact that in the late phase of the infection, *Rickettsia* pass from blood vessels to the spleen (9, 13).

Infection with *A. phagocytophilum* in deer is long-term and subclinical. In fact, any species of this family may be a reservoir for the microbes. The presence of *Rickettsia* has been confirmed among others in the following: red deer, elk, roe deer and fallow deer (14-16). Long-term bacteremia makes the deer a competent reservoir of *Rickettsia* and contributes to the circulation of the pathogen in nature. In research conducted by Adamska and Skotarczak (15), the DNA of *A. phagocytophilum* in roe deer was detected mainly in the blood, and only occasionally in spleen samples.

There are reports of infection with *A. phagocytophilum* in wild boar (17) and European bison (9). Michalik et al. (17) detected bacteremia in 9-20% of wild boar in Poland. Most gene sequences of *Rickettsia* were identical to those of the bacteria strains which cause granulocytic anaplasmosis in humans.

W stanach Zjednoczonych, na terenach endemicznych dla anaplazmozy granulocytarnej (stany Wisconsin i New York), obecność przeciwciał dla riketsji wykazano w surowicy 15-36% ludzi. W Europie odsetek ten waha się w przedziale 1-20% (11).

Wektorami *A. phagocytophilum*, w zależności od kontynentu, są kleszcze: *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp. i *Haemophysalis* spp. Głównym wektorem riketsji w Europie jest *Ixodes ricinus* (8). By doszło do zakażenia riketsjami konieczne jest żerowanie zakażonych kleszczy na powierzchni ciała wrażliwego osobnika przynajmniej 4-24 godzin (12). Zachorowania na anaplazmozę granulocytarną pojawiają się najczęściej w okresie wiosennym i jesiennym – sezonie aktywności kleszczy. W rejonach endemicznych dla anaplazmozy jednostce tej towarzyszyć mogą inne choroby odkleszczowe jak borelioza czy babeszjoza (8,13).

W populacji kleszczy *A. phagocytophilum* przekazywana jest tylko transstadialnie. W związku z tym, aby pajęczaki mogły ulec zakażeniu, w ich środowisku bytowania konieczna jest obecność rezerwuaru riketsji, który stanowią zwierzęta domowe i dziko żyjące (2,14).

ZWIERZĘTA DZIKO ŻYJĄCE JAKO REZERWUAR *A. PHAGOCYTOPHILUM*

Głównym rezerwuarem *A. phagocytophilum* w przyrodzie są gryzonie leśne i zwierzyna płowa. Badania przeprowadzone przez Bowna i wsp. (13) w Wielkiej Brytanii pozwoliły stwierdzić, że okres bakteriemii u gryzoni jest krótki i trwa kilka tygodni, a największe nasilenie infekcji na tle *A. phagocytophilum* notowano późnym latem i jesienią. Częściej obecność omawianych drobnoustrojów u gryzoni stwierdzano w próbkach śledziony niż we krwi. Wynika to z faktu, iż w późnej fazie infekcji riketsje przemieszczają się z naczyń do śledziony (9,13).

Jeleniowate przechodzą długotrwałą infekcję *A. phagocytophilum* o subklinicznym przebiegu. W zasadzie rezerwuarem drobnoustrojów może być każdy gatunek z tej rodziny. Obecność riketsji potwierdzono w organizmach m.in.: jeleni szlachetnych, łosi, saren i danieli (14-16). Długotrwała bakteremia sprawia, że zwierzyna płowa jest kompetentnym rezerwuarem riketsji i przyczynia się do krążenia patogena w przyrodzie. Wyniki badań prowadzonych przez Adamską i Skotarczak (15) wykazały, że u saren DNA *A. phagocytophilum* wykrywano głównie we krwi, a tylko sporadycznie w próbkach śledziony.

Dostępne są doniesienia na temat występowania infekcji na tle *A. phagocytophilum* u dzików (17) i żubrów (9). Michalik i wsp. (17) wykazali, że stopień bakteriemii u przebadanych dzików z Polski wynosił 9-20%, a większość analizowanych sekwencji genów riketsji była identyczna z sekwencjami genów szczepów wywołujących anaplazmozę granulocytarną u ludzi.

Wild felines and canines can be reservoirs of *A. phagocytophilum* as well. A case of acute granulocytic anaplasmosis in a wolf was reported in Austria (18), and there were confirmed cases of infection with *A. phagocytophilum* in foxes in Poland (19). Studies conducted by Karbowski et al. (19) indicate that the percentage of foxes infected with *Rickettsia* in north-eastern Poland was 2.7% (out of 111 tested foxes, in 3 cases *A. phagocytophilum* was detected in the blood). It seems that dogs, cats and humans are infected accidentally and are not significant sources of infection.

The role of wild birds in the circulation of *A. phagocytophilum* in nature is unclear. Studies by Naranjo et al. showed the presence of *Rickettsia* genetic material in the organisms of 22% of birds from southern Europe (20). In Sweden, 6-9% of *I. ricinus* larvae collected from migratory birds were infected with *A. phagocytophilum*, which indicates that these animals may play a role in spreading *Rickettsia* over long distances (21).

PATHOGENESIS

A. phagocytophilum inhibits the apoptosis of host cells and impairs mechanisms related to energy production, transmission of signals in the cell, transport and defensive reactions (22, 23). *A. phagocytophilum* reproduces in cell lines of human myeloid leukemia (HL-60, KG-1, THP-1), Chinese hamster ovary (CHO) and ticks (IDE8). *Rickettsia* can infect endothelial cells, bone marrow progenitor cells, bone marrow-derived mast cells (BMMCs) and human skin cells. Studies conducted using cell lines suggest that it is possible for *A. phagocytophilum* to attack mast cells at the site of the tick bite (1, 23).

The pathogen has unique pathogenicity and exhibits tropism to cells of the haematopoietic and phagocytic systems. *Rickettsia* spread in the organism through blood and lymph vessels, resulting in bone marrow damage and pancytopenia, especially thrombocytopenia. The mechanisms responsible for the decline in the number of platelets in the course of infection remain unexplained. It is supposed that thrombocytopenia is due to the destruction of thrombocytes by cells of the immune system, increased phagocytosis by macrophages and severe disintegration in the spleen. Bone marrow hypoplasia, which develops in the course of the disease, may also cause thrombocytopenia. *A. phagocytophilum* attacks many organs and tissues, resulting in the development of inflammatory lesions, mainly in the spleen, kidneys, lungs, liver and heart (1, 23, 24).

Rezerwuarem *A. phagocytophilum* mogą być także dzikie kotowate i psowate. Opisano przypadek ostrego przebiegu anaplazmozy granulocytarnej u wilka w Austrii (18) oraz potwierdzono przypadki infekcji na tle *A. phagocytophilum* u lisów w Polsce (19). Jak wynika z badań Karbowski i wsp. (19) odsetek lisów zakażonych riketsjami w północno-wschodniej Polsce wynosi 2,7% (spośród 111 przebadanych lisów w 3 przypadkach wykryto obecność w ich krwi *A. phagocytophilum*). Wydaje się natomiast, że psy, koty i ludzie zakażani są przypadkowo i nie są istotnym źródłem zakażenia.

Udział ptaków dzikich w krążeniu *A. phagocytophilum* w przyrodzie jest niejasny. Badania Naranjo i wsp. wykazały obecność materiału genetycznego riketsji w organizmach 22% ptaków z południowej Europy (20). Natomiast w Szwecji 6-9 % larw *I. ricinus* zebranych z ptaków wędrownych było zakażonych *A. phagocytophilum*, co wskazuje, że zwierzęta te mogą odgrywać rolę w rozprzestrzenianiu się tych riketsji na duże odległości (21).

PATOGENEZA

A. phagocytophilum hamuje procesy apoptozy komórek gospodarza i upośledza mechanizmy związane z wytwarzaniem energii, przekazywaniem sygnałów w komórce, transportem oraz reakcjami obronnymi (22,23). *A. phagocytophilum* namnaża się na liniach komórkowych ludzkich białaczek szpikowych (HL-60, KG-1, THP-1), na komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO) oraz komórkach kleszczy (IDE8). Riketsje mogą zakażać komórki śródbłonna i progenitorowe szpiku kostnego, a także linie pochodne mastocytów (BMMCs) i komórek skóry człowieka. Badania prowadzone na liniach komórkowych pozwalają przypuszczać, że możliwe jest atakowanie przez *A. phagocytophilum* komórek tucznych w miejscu ukąszenia przez kleszcza (1,23).

Patogen posiada unikalne właściwości chorobotwórcze i wykazuje tropizm do komórek układu hematopoetycznego i fagocytarnego. Riketsje rozprzestrzeniają się po całym organizmie drogą naczyń krwionośnych i chłonnych, co prowadzi do uszkodzenia szpiku kostnego oraz pancytopenii, zwłaszcza trombocytopenii. Mechanizmy odpowiadające za spadek liczby płytek krwi w przebiegu zakażenia pozostają niewyjaśnione. Przypuszcza się, że małopłytkowość jest efektem: niszczenia trombocytów przez komórki układu immunologicznego, zwiększonej ich fagocytozy przez makrofagi oraz nasilonym rozpadem w śledzionie. Hipoplazja szpiku rozwijająca się w przebiegu choroby także może być przyczyną trombocytopenii. *A. phagocytophilum* atakuje wiele narządów oraz tkanek powodując rozwój zmian zapalnych głównie w: śledzionie, nerkach, płucach, wątrobie i sercu (1,23,24).

COURSE OF INFECTION IN WILD ANIMALS

Typically, the course of the disease is mild, but there are also fatal cases. In animals infected with *Rickettsia*, the observed symptoms include fever, apathy and lack of appetite. Haematological tests, on the other hand, demonstrate such changes in the blood as thrombocytopenia, lymphopenia, and mild anaemia (18).

In most cases, the course of the disease in wild animals is subclinical, although there are reports of acute anaplasmosis. Jenkins et al. (16) observed bacteremia, fever, and neutropenia in 3 reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*), experimentally infected with *A. phagocytophilum*. Joint-swelling, bleeding from mucous membranes and neurological symptoms have been noted in pets and livestock (14, 20).

DIAGNOSIS

A microscopic examination of blood smears from sick animals, stained using the Diff-Quick, Wright or Giemsa methods, demonstrates the presence of *A. phagocytophilum* morulae in the cytoplasm of granulocytes. Morulae are dark blue to purple inclusions, composed of many individual, round, oval or rod-shaped cells with a size of 0.18-1.4 µm. Sometimes the morulae disintegrate to individual cells (3, 18).

Currently, methods of molecular biology, especially PCR (polymerase chain reaction), are used in the diagnosis of granulocytic anaplasmosis and in the assessment of the epidemiological situation of the disease. Jenkins et al. (16) confirmed a case of an *A. phagocytophilum* infection in an elk (*Alces alces*) in Norway, based on the results of a microscopic examination of blood smears and sequencing of the PCR product. The PCR technique allows for an early diagnosis of the infection. The DNA necessary for this test can be isolated from whole blood, leukocytes, bone marrow or spleen fragments. Determining the sequence of obtained amplicons provides valuable information for an epidemiological and taxonomic analysis (8, 14).

Serological examinations, based on the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and the ELISA test, are also used in the diagnosis of the infection (18). These tests have a limited utility in the diagnosis of the acute phase, when antibodies specific for *A. phagocytophilum* have yet to be produced in the serum of the infected individual. As an intracellular pathogen, *A. phagocytophilum* is sensitive to few chemotherapeutic agents. Tetracyclines are antibiotics of choice in the treatment of granulocytic anaplasmosis (10). Due to the fact that the course of the infection in wild animals is usually asymptomatic, there is no need to introduce antibiotic treatment in those cases (9).

PRZEBIEG INFEKЦИИ U ZWIERZĄT DZIKO ŻYJĄCYCH

Zazwyczaj choroba przebiega łagodnie, choć występują również przypadki śmiertelne. U zwierząt zakażonych riketsjami obserwowano rozwój objawów ogólnych jak: gorączka, brak apetytu, apatia, zaś badaniem hematologicznym wykazano zmiany w obrazie krwi, takie jak: trombocytopenia, limfopenia i łagodna anemia (18).

W większości przypadków przebieg choroby u zwierząt dziko żyjących jest subkliniczny, aczkolwiek istnieją doniesienia o ostrej anaplazmozie. Jenkins i wsp. (16) obserwowali u 3 reniferów (*Rangifer tarandus tarandus*) zakażonych eksperymentalnie *A. phagocytophilum* rozwój bakteriemii, gorączkę i neutropenię. U zwierząt domowych i gospodarskich notuje się obrzęki stawów, krwawienia z błon śluzowych czy objawy neurologiczne (14,20).

ROZPOZNAWANIE CHOROBY

Badaniem mikroskopowym rozmazów krwi pobranej od chorych osobników barwionych metodą Diff-Quick, Wrighta lub Giemzy obecność moruli *A. phagocytophilum* wykazać można w cytoplazmie granulocytów. Morule to wtręty koloru od ciemnoniebieskiego do fioletowego, zbudowane z wielu delikatnych ciałek początkowych kształtu okrągłego, owalnego lub pręcikowatego, o wielkości 0,18-1,4 µm. Czasem ulegają rozpadowi do pojedynczych ciałek podstawowych (3,18).

Obecnie w rozpoznawaniu anaplazmozy granulocytarnej oraz w ocenie sytuacji epidemiologicznej tej choroby wykorzystywane są metody biologii molekularnej, szczególnie technika PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy). Jenkins i wsp. (16) potwierdzili przypadek zakażenia *A. phagocytophilum* łosia (*Alces alces*) w Norwegii opierając się na wynikach badania mikroskopowego rozmazów krwi i sekwencjonowaniu produktu PCR. Technika PCR pozwala na wczesne rozpoznanie zakażenia, a materiałem, z którego można izolować DNA do tego badania, może być: pełna krew, leukocyty, szpik kostny lub skrawki śledziony. Określanie sekwencji uzyskanych ampliconów dostarcza cennych informacji do analizy epidemiologicznej i taksonomicznej (8,14).

W rozpoznawaniu infekcji wykorzystywane są także badania serologiczne oparte na pośrednim teście immunofluorescencyjnym - IFAT (ang. *Indirect Fluorescent Antibody Test*) i teście ELISA (18). Testy te mają ograniczoną przydatność w diagnostyce ostrej fazy zakażenia, gdy nie doszło jeszcze do wytworzenia specyficznych dla *A. phagocytophilum* przeciwciał w surowicy zainfekowanego osobnika. *A. phagocytophilum* jako patogen wewnątrzkomórkowy jest wrażliwy na nieliczne chemioterapeutyki, a w leczeniu anaplazmozy granulocytarnej tetracykliny są grupą antybiotyków z wyboru (10). Z racji tego, że przebieg zakażeń u zwierząt dziko żyjących jest z reguły bezobjawowy, nie ma konieczności wdrażania w ich przypadku antybiotykoterapii (9).

THREAT TO HUMAN HEALTH

The first reports of infection with *A. phagocytophilum* in humans in the United States (states of Minnesota and Wisconsin) come from 1994 (25). Clinically, the course of human granulocytic anaplasmosis (HGA) is similar to infections with *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii*. The incubation period of the disease is 2-3 weeks (10). Patients experience flu-like symptoms: fever, apathy, headaches and muscle and joint pain (1, 3). Haematological and biochemical studies reveal leukopenia, thrombocytopenia (which may be accompanied by anaemia) and an increase in the activity of liver enzymes (10). In severe infections, fever may persist despite treatment. Patients may develop respiratory failure, acute kidney injury, rhabdomyolysis and gastrointestinal bleeding. Secondary infections may also occur (1, 10). In the acute phase of the infection in humans, the levels of interferon-gamma and interleukin-10 are significantly increased, suggesting the participation of monocytes in the production of these pro-inflammatory cytokines (26).

The infection is transmitted to humans mainly through ticks, but studies by *Bakken et al.* (27) indicate that direct contact with the blood of animals infected with *Rickettsia* may also result in the development of the disease. The authors of the study describe the occurrence of HGA in people working in the processing of deer meat. None of the infected patients had contact with ticks, but while working with meat they did not use protective gloves or masks. The infection was confirmed using the PCR method, and treatment with doxycycline proved to be fully effective. The above information indicates that in some cases the disease can be transmitted in other ways than just through ticks. It stresses the importance of wild animals as a reservoir of *A. phagocytophilum* for humans (9).

Infection can also occur as a result of a direct contact of healthy persons with the blood and respiratory tract secretions of persons infected with *A. phagocytophilum*. Such nosocomial infections were reported by *Zhang et al.* (28). Among other routes of transmission of the disease, blood transfusions should be mentioned. This procedure is the simplest way to introduce pathogens into the body, for which reason all blood donors should be monitored for anaplasmosis.

Human granulocytic anaplasmosis has also been reported in Poland, especially in the eastern regions of the country (29, 30). It can develop independently or accompany other infections, such as Lyme borreliosis or tick-borne encephalitis (29). Most cases of Rickettsial infection were asymptomatic and remitted spontaneously (30). So far, no fatal cases of infections in humans in Poland have been described. However, due to the constant occurrence of *A. phagocytophilum* in the country, both in ticks and wild animals, which

ZAGROŻENIE ZDROWIA CZŁOWIEKA

Pierwsze przypadki zakażeń na tle *A. phagocytophilum* u ludzi w Stanach Zjednoczonych (stany Minnesota i Wisconsin) pochodzą z roku 1994 (25). Klinicznie przebieg anaplazmozy granulocytarnej u ludzi (ang. *Human Granulocytic Anaplasmosis - HGA*) jest podobny jak przy zakażeniach na tle *Ehrlichia chaffeensis* i *Ehrlichia ewingii*. Okres inkubacji choroby wynosi 2-3 tygodnie (10). U pacjentów notuje się objawy grypopodobne: gorączkę, apatię, bóle głowy, bóle mięśni oraz stawów (1,3). Badaniami hematologicznymi i biochemicznymi wykazać można leukopenię, trombocytopenię, którym może towarzyszyć niedokrwistość oraz podwyższenie aktywności enzymów wątrobowych (10). W ciężkich infekcjach gorączka może utrzymywać się pomimo podjętego leczenia. U pacjentów rozwinąć może się niewydolność oddechowa, ostra niewydolność nerek, rhabdomyoliza, pojawiać mogą się krwawienia z przewodu pokarmowego. Dochodzi także do rozwoju wtórnych zakażeń (1,10). W ostrej fazie infekcji u ludzi, poziom gamma interferonu i interleukiny-10 ulegają znacznemu podwyższeniu, co wskazuje na udział monocytów w produkcji tych prozapalnych cytokin (26).

Infekcja na ludzi przenoszona jest głównie za pośrednictwem kleszczy, jednakże wyniki badań *Bakkena i wsp.* (27) wskazują, iż także bezpośredni kontakt ludzi z krwią zwierząt zakażonych riketsjami może skutkować rozwojem choroby. W przytaczanym doniesieniu autorzy opisują wystąpienie HGA u osób pracujących przy obróbce tusz jeleni. Żaden z zakażonych pacjentów nie miał kontaktu z kleszczami, natomiast w czasie pracy przy tuszach zwierząt nie używano rękawic ochronnych ani masek. Zakażenie potwierdzono metodą PCR, zaś leczenie za pomocą doksycykliny okazało się w pełni skuteczne. Powyższe informacje wskazują, iż w pewnych sytuacjach choroba może być przenoszona innymi drogami aniżeli tylko za pośrednictwem kleszczy i podkreśla znaczenie zwierząt dziko żyjących jako rezerwuaria *A. phagocytophilum* dla człowieka (9).

Do zakażenia może także dojść na skutek kontaktu bezpośredniego osób zdrowych z krwią i wydzieliną z dróg oddechowych osób zakażonych *A. phagocytophilum*. O tego typu przypadkach będących zakażeniami szpitalnymi donoszą *Zhang i wsp.* (28). Z innych dróg przenoszenia choroby wymienić należy także transfuzje krwi. Zabieg ten stanowi najprostszą drogę wprowadzenia do organizmu patogenów, w związku z czym wszyscy dawcy krwi powinni być monitorowani m. in. w kierunku anaplazmozy.

Anaplazmoza granulocytarnej u ludzi jest chorobą notowaną także w Polsce, zwłaszcza na terenach wschodnich naszego kraju (29,30). Może ona przebiegać jako jednostka występująca samoistnie lub towarzyszyć innym infekcjom, jak borelioza czy odkleszczowe zapalenie mó-

constitute reservoirs of *Rickettsia* for arachnids, the prevalence of the disease in humans should be monitored. The fact that the course of HGA can be acute should be a warning against underestimating this disease. It suggests the need to include it in the differential diagnosis of vector-borne diseases.

zgu (29). Większość przypadków zakażeń na tle riketsji przebiegała bezobjawowo i ustępowała samoistnie (30). Dotychczas nie opisano śmiertelnego przypadku infekcji u ludzi w Polsce, niemniej jednak stałe utrzymywanie się *A. phagocytophilum* na obszarze naszego kraju zarówno w organizmach kleszczy, jak i zwierząt dziko żyjących, stanowiących rezerwuar riketsji dla pajęczaków, wskazuje na konieczność monitoringu choroby u ludzi. Fakt, iż przebieg HGA może być ostry, powinien być czynnikiem przestrzegającym przed bagatelizowaniem tej jednostki i wskazuje na konieczność uwzględnienia jej w diagnostyce różnicowej chorób wektorowych.

REFERENCES

- Dumler JS, Barbet AF, Bekker C P, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:2145–2165.
- Dunning Hotopp JC, Lin M, Madupu R, et al. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet* 2006;2:E21.
- Sells DM, Hildebrandt PK, Lewis GE, et al. Ultrastructural observations on *Ehrlichia equi* organisms in equine granulocytes. *Infect Immun* 1976;13:273.
- Baráková I, Derdáková M, Carpi G, et al. Genetic and ecologic variability among *Anaplasma phagocytophilum* strains, Northern Italy. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1082–1085.
- Massung RF, Priestley RA, Miller NJ, et al. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *J Infect Dis* 2003;188:1757–1763.
- Massung RF, Mather TN, Levin ML. Reservoir competency of goats for the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun* 2006;74:1373–1375.
- Jahfari S, Coipan EC, Fonville M, et al. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasite Vector* 2014;7:365.
- Dzięgiel B, Kubrak T, Adaszek Ł, et al. Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in hard ticks collected from meadows of Lubelskie Voivodship (eastern Poland). *Bull Vet Inst Pulawy* 2014;58:29–33.
- Dzięgiel B, Adaszek Ł, Krzysiak M, et al. The identification of *Anaplasma phagocytophilum* in wild bison from Białowieża Primeval Forest in eastern Poland. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 2015;7/8:310–314.
- Atif FA. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: *Rickettsiales* pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol Res* 2015;114:3941–3957.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2013) Statistics and epidemiology of anaplasmosis. <http://www.cdc.gov/anaplasmosis/>. Accessed 21 April 2015
- Ismail N, Bloch KC, McBride J. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med* 2010;30:261–292.
- Bown KJ, Begon M, Bennett M, et al. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2003;9:63–70.
- Adaszek Ł, Klimiuk P, Skrzypczak M, et al. The identification of *Anaplasma* spp. isolated from fallow deer (*Dama dama*) on a free-range farm in eastern Poland. *Pol J Vet Sci* 2012;15:393–394.
- Adamska M, Skotarczak B. Wild game as a reservoir of *Anaplasma phagocytophilum* in north-western Poland. *Wiad Parazytol* 2007;53:103–7.
- Jenkins A, Handeland K, Stuen S, et al. Ehrlichiosis in a moose calf in Norway. *J Wildl Dis* 2001;37:201–203.
- Michalik J, Stańczak J, Cieniuch S, et al. Wild boars as hosts of human-pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* variants. *Emerg Infect Dis* 2012;18:998–1001.
- Leschnik M, Kirtz G, Virányi Z, et al. Acute granulocytic anaplasmosis in a captive timber wolf (*Canis lupus occidentalis*). *J Zoo Wildl Med* 2012;43:645–648.
- Karbowiak G, Vichova B, Majlathova V, et al. *Anaplasma phagocytophilum* infection of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Ann Agric Environ Med* 2009;16:299–300.
- Naranjo V, Ruiz-Fons F, Höfle U, et al. Molecular Epidemiology of Human and Bovine Anaplasmosis in Southern Europe. *Ann NY Acad Sci* 2006;1078:95–99.

21. Bjöersdorff A, Bergström S, Massung RF, et al. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. *Emerg Infect Dis* 2001;7:877–879.
22. Lin M, Kikuchi T, Brewer HM, et al. Global proteomic analysis of two tick-borne emerging zoonotic agents: *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. *Front Microbiol* 2011;2:24.
23. Ojogun N, Barnstein B, Huang B, et al. *Anaplasma phagocytophilum* infects mast cells via alpha1,3-fucosylated but not sialylated glycans and inhibits IgE-mediated cytokine production and histamine release. *Infect Immun* 2011;79:2717-2726.
24. Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:328-339.
25. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, et al. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 1994;32:589–595.
26. Dumler JS, Triggiani ER, Bakken JS, et al. Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:6–8.
27. Bakken JS, Krueth JK, Lund T, et al. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 1996;23:198.
28. Zhang L, Wang G, Liu Q, et al. Molecular Analysis of *Anaplasma phagocytophilum* Isolated from Patients with Febrile Diseases of Unknown Etiology in China *PLoS One* 2013;8:e57155.
29. Grzeszczuk A. *Anaplasma phagocytophilum* in Ixodes ricinus ticks and human granulocytic anaplasmosis seroprevalence among forestry rangers in Białystok region. *Adv Med Sci* 2006;51:283-286.
30. Hermanowska-Szpakowicz T., Skotarczak B., Kondrusik M., et al. Detecting DNAs of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* in the blood of patients suspected of Lyme disease. *Ann Agric Environ Med* 2004;11:351-354

Received: 6.10.2015

Accepted for publication: 7.06.2016

Otrzymano: 6.10.2015 r.

Zaakceptowano do publikacji: 7.06.2016 r.

Adres do korespondencji:

Address for correspondence:

mgr inż. Beata Dzięgiel

Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases,

Faculty of Veterinary Medicine of the University of Life Sciences in Lublin

ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland

E-mail: beatadziegiel@o2.pl