

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

ANA ARAČIĆ

IZLOŽENOST PASA OBLIĆIMA *DIROFILARIA* SP.

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ZAVOD ZA PARAZITOLOGIJU I INVAZIJSKE BOLESTI S KLINIKOM

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Dagny Stojčević Jan

Mentor: prof. dr. sc. Tatjana Živičnjak

dr. sc. Franjo Martinković

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Albert Marinculić

2. dr. sc. Franjo Martinković

3. prof. dr. sc. Tatjana Živičnjak

4. prof. dr. sc. Frane Božić (zamjena)

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr.sc. Franje Martinkovića i prof.dr.sc. Tatjane Živičnjak. U akademskoj godini 2014./2015. za rad je dobivena Rektorova nagrada.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. HIPOTEZA	3
3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	3
4. MATERIJAL I METODE	3
4.1 Uzorci	3
4.2 Dokazivanje mikrofilarija u krvi	4
4.3 Određivanje vrste mikrofilarija	4
4.4 Određivanje brojnosti mikrofilarija u krvi	4
4.5 Dokazivanje prisutnosti protutijela protiv mikrofilarija	4
5. REZULTATI	6
5.1 Knottov test	6
5.2 Vrste mikrofilarija	6
5.3 Brojnost mikrofilarija	8
5.4 Prisutnost protutijela protiv mikrofilarija	9
6. RASPRAVA	14
7. ZAKLJUČAK	17
8. LITERATURA	18
9. SAŽETAK	21
10. SUMMARY	22
11. ŽIVOTOPIS	23

1.UVOD

Oblici *Dirofilaria immitis* i *Dirofilaria repens*, pripadaju porodici Onchocercidae, redu Spirurida. Rod *Dirofilaria* je podijeljen u dva podroda. *D. immitis* pripada podrodu *Dirofilaria*, a *D. repens* podrodu *Nochtiella* (GENCHI i sur., 2007). Parazitiraju u domaćih pasa, mačaka, lisica i drugih divljih mesojeda koji žive na tropskim, toplim područjima, no isto tako mogu parazitirati i u ljudi (ARANDA i sur., 1998). Biološki vektor u razvoju ovih parazita su komarci. Više vrsta komaraca (*Anopheles*, *Aedimorphus*, *Armigeres*, *Ochlerotatus*, *Stegomyia*, *Culex*, *Coquillettidia* i *Mansonia*) mogu biti biološki vektori ovih parazita (OTRANTO i sur., 2013). U nositeljima se, u većini slučajeva adulti *D. immitis* nalaze u desnoj srčanoj klijetki i pulmonarnoj arteriji dok se adulti *D. repens* nalaze u potkožju. Komarac tijekom hranjenja zajedno s krvi unese i mikrofilarije koje u njemu migriraju do Malpigijevih tubula. Tamo dozrijevaju u drugi (L2) te potom u treći larvarni oblik (L3). Zatim putuju do usnog aparata komarca putem kojeg će biti inokulirane u novog nositelja tijekom slijedećeg obroka. Kada L3 dođe u nositelja, ona putuje po potkožnim i subseroznim tkivima i mišićima gdje može ostati i sazrijeti ako se radi o *D. repens* ili mogu nakon 60-90 dana prijeći u L5 (odrasli oblik) koji putuje do pulmonarnih arterija i desne strane srca. Ženke *D. immitis* nakon 120-180 dana, *D. repens* nakon 189-259 dana počinju producirati mikrofilarije (OTRANTO i sur., 2013). Ženke *D. immitis* su duge 30 cm, a mužjaci 23 cm. Mužjacima je spiralno savijen stražnji kraj repa (ÖNCEL i VURAL, 2005). Oba spola se hrane krvnom plazmom. Mikrofilarije su dužine 290-330 µm, širine 5-7 µm koje mogu preživjeti 2-18 mjeseci u cirkulaciji (GENCHI i sur., 2007). Ženke *D. repens* su duge 100-170 mm, mužjaci 50-70 mm (GENCHI i sur., 2007). Mikrofilarije *D. repens* su prosječne duljine 325-375 µm, širine 6-8 µm sa zavnutim stražnjim krajem. Mikroskopski se lako razlikuju od mikrofilarija *D. immitis* jer su veće i duže i imaju deblji rep (MAZURKEVICH i sur., 2004). Invadirani psi mogu imati mikrofilarije u krvi, ali mogu imati i skrivenu dirofilariozu u kojoj posjeduju adulte parazita, ali ne i same mikrofilarije (TAMASHIRO i sur., 1985). Čovjek je slučajni nosilac larvi ili adultnih oblika, no u krvi on nema mikrofilarije (ĐORĐEVIĆ i sur., 2010). Adulti *D. repens* uzrokuju razne promjene u tijelu psa poput nodularnog multifokalnog dermatitisa, egzantema, alopecije, eritema, hiperpigmentacije, hiperkeratoze. Lokalne promjene na koži su povezane s prisutnošću adulata ispod kože ili mikrofilarija u koži (DEMIKIEWICZ i sur., 2014). U ljudi se javljaju potkožne i subkonjuktivalne te plućne invazije (ĐORĐEVIĆ i sur., 2010). Dirofilariozu možemo dokazati modificiranom Knott-

ovim testom koji dokazuje prisutnost mikrofilarija u cirkulaciji, ELISA-om kojom dokazujemo prisutnost protutijela specifičnih za reproduktivni sustav ženke. To znači da njom možemo dokazati samo prisutnost ženki, a ako se radi o invaziji s mužjacima test će biti negativan (CARLETON i TOLBERT, 2004). Ostale serološke pretrage su western blotting kojim dokazujemo prisutnost protutijela protiv antigenih proteinskih frakcija parazita, indirektna imunofluorescencija kojom dokazujemo prisutnost protutijela protiv mikrofilarija (SISSON i sur., 1985). Kad je došlo do razvoja bolesti, dirofilariozu možemo dokazati radiografijom, elektrokardiografijom, ehokardiografijom. Profilaksa se ostvaruje primjenom makrocikličkih laktona (avermektina i milbemicina) i dietilkarbamazina. Liječenje dirofilarioze nije jednostavno, zbog mogućeg nastanka tromboembolije nakon tretmana. Kao jedini učinkoviti lijek za adulticidnu terapiju u pasa se navodi melarsormin dihidroklorid (GUERRERO, 2005). Prema istraživanju TAMASHIRA i sur. (1989) kao lijek protiv mikrofilarija je dobar ivermektin u nižim dozama koji ubija mikrofilarije bez gotovo ikakvih posljedica za nositelja. Prijenos i prisutnost *Dirofilaria* sp. na određenom području ovisi o okolišnim čimbenicima. Razvoj u komarcu ovisi o temperaturi komarca (8-10 dana 28-30°C, ali 16-20 dana na 22°C). Stoga je invadiranost pasa češća u južnoj Europi nego u sjevernim zemljama (SAEVIK i sur., 2014). Bolest je evidentirana u više zemalja, npr. u Portugalu, Španjolskoj, Francuskoj, Sloveniji, Srbiji, Grčkoj, Austriji, Rumunjskoj, Mađarskoj, Turskoj, SAD-u, Argentini, Brazilu, Meksiku, Maleziji, kao i u mnogim afričkim državama (HOLLER i sur., 2010). Sve veća migracija invadiranih životinja, širenje vektora, globalno zagrijavanje i promjene u ljudskoj aktivnosti dovode do rasta broja invadiranih životinja i ljudi. Tako je u posljednjih 30 godina prijavljeno 28 slučajeva dirofilarioze u ljudi (PAMPGLIONE i sur. 2008). U medijima se u zadnje vrijeme počelo pisati o dirofilariozi u Hrvatskoj. Posljednjih mjeseci pojavilo se pet slučajeva dirofilarioze u Hrvatskoj na području Osječko-Baranjske županije (LEPAN ŠTEFANČIĆ, 2015). U jednom od članaka se navodi da se točan broj oboljelih ljudi u Hrvatskoj ne zna, ali se smatra da godišnje oboli do 10 ljudi. Molekularnom tipizacijom je dokazano da su sva oboljenja ljudi u Hrvatskoj uzrokovana s *D. repens* (ANONYMUS, 2015).

2.HIPOTEZA

Oblici roda *Dirofilaria spp.* parazitiraju u životinja koje borave na toplim i vlažnim područjima, posebice uz rijeke i šume gdje obitava veći broj vektora. Adulti *Dirofilaria sp.* mogu uzrokovati razne promjene u tijelu nositelja ovisno o vrsti samog parazita i mjestu parazitiranja, no najveći broj pasa su asimptomatski nositelji parazita tako da se dijagnoza dirofilarioze u većini slučajeva postavlja slučajno. Mikrofilarije su larvalni oblici parazita *Dirofilaria sp.*, koje nalazimo u krvi pasa kod kojih se razvila patentna invazija što predstavlja indirektnu potencijalnu opasnost za druge životinje i ljude te su direktni izvor invazije za vektore. Psi koji žive zajedno s mikrofilaremičnim psima vjerojatno će također biti ili mikrofilaremični ili seropozitivni, što ukazuje na kontakt nosioca s vektorima koji nisu specifični za vrstu životinje, tj. čovjeka. Hipoteza ovog istraživanja je da će broj seropozitivnih pasa biti veći od mikrofilaremičnih pasa stoga što sve životinje ne moraju biti u stadiju patentne invazije, ali su razvile protutijela na parazitske antigene. Isto tako bi broj invadiranih životinja koje uglavnom borave vani, na toplim i vlažnim područjima, gdje ima više vektora, trebao biti veći u usporedbi s kućnim psima.

3.OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Utvrđiti prisutnost mikrofilarija *Dirofilaria sp.* i prisutnost protutijela u istih pasa te dobivene nalaze međusobno usporediti kako bi se dobio uvid u stvarno stanje životinja koje su bile u kontaktu s oblicima *Dirofilaria sp.*

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzorci

Istraživanje je provedeno na 72 uzorka krvi. Krvi pasa su sakupljane u sklopu provođenja veterinarske djelatnosti na nekoliko lokacija:

1) nasumično odabrana 22 uzorka krvi pasa s područja Slavenskog Broda, koje pripada području pojavnosti oblika *D. repens*, skupljena Od 01.12.2014. do 15.02. 2015. (hematologija, biokemija).

2) nasumično odabran 31 uzorak krvi pasa koji borave vani u prirodi, Pukovnije Vojne policije, Zagreb, pristigao 22.01.2015. (u svrhu pretrage krvi na prisutnost mikrofilarija oblića *Dirofilaria* sp.).

3) nasumično odabrano 19 uzoraka krvi pasa pristiglih na Zavod za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom u periodu od 01.09.2014. do 23.12. 2014. (u svrhu pretrage krvi na prisutnost antitijela protiv bičaća *Leishmania infantum*).

4.2. Dokazivanje mikrofilarija u krvi

Krv pasa je analizirana modificiranim Knottovim testom (GENCHI i sur., 2007), na slijedeći način: 1 ml venske krvi je pomiješan s 9 ml 2 % formalina i centrifugiran na 1500g. Potom je supernatant odličen, a u sediment je dodano metilensko modriilo (1:1000). Sediment je stavljen na predmetnicu, pokriven pokrovnicom i gledan pod mikroskopom Olympus Cx22 .

4.3. Određivanje vrste mikrofilarije

Vrsta oblića *Dirofilaria* sp. je utvrđena temeljem duljine tijela pronađenih mikrofilarija pomoću umjerenog sustava za fotografiranje i mjerenje (digitalna kamera Artcam 300MI i mikroskop Olympus Bx51, softver za obradu fotografija QuickPHOTO MICRO 2.3.).

4.4. Određivanje broja mikrofilarija u krvi

Nakon provedenog Knottovog testa, u svaki uzorak, je dodana određena količina 2% formalina kako bi završni volumen uzorka za pregledavanje bio 1ml. Iz svakog pozitivnog uzorka je otpipetirano 50 µl tekućine, mikroskopirano (40x povećanje) i utvrđen je broj mikrofilarija. Postupak je ponovljen četiri puta. Dobiveni broj mikrofilarija je pomnožen sa 5 te je tako određen broj mikrofilarija u 1 ml krvi.

4.5. Dokazivanje prisutnosti protutijela protiv mikrofilarija

Metodom indirektne imunofluorescencije (GRIEVE i sur., 1985) analizirano je 63 uzorka seruma/plazme. Antigen je pripremljen na slijedeći način: mikrofilarije su izdvojene iz krvi primjenom Knottovog testa, ali bez formalina i metilenskog plavila. Potom su ispirane u fosfatnom puferom pH 7.2 (phosphate-buffered-saline, PBS), centrifugiranjem na 1500g, trokratno. Nakon ispiranja, broj mikrofilarija je namješten na 8000/ml. Na svako polje predmetnice sa deset polja nakapano je 2,5 μ l te suspenzije (20 mikrofilarija/polju). Predmetnice su zatim osušene, fiksirane metanolom pet minuta, osušene i pohranjene na +4 °C do upotrebe. Indirektna imunofluorescencija je provedena tako da je antigen izložen serumima razrijeđenim 1/20 i 1/40 u PBS-u i inkubiran u vlažnoj komori, 30 minuta pri 37°C. Nakon što su serumi odstranjeni, predmetnice su trokratno isprane pet minuta u PBS-u i osušene na sobnoj temperaturi. Potom su na antigen nanesa antipseća protutijela obilježena fluoresceinom i inkubirana 30 minuta pri 37°C. Opet je ponovljeno trokratno ispiranje pet minuta u PBS-u i sušenje na sobnoj temperaturi. Rezultati testa očitani su fluorescentnim mikroskopom "Olympus Cx40" zatim su analizirani i podvrgnuti statističkoj obradi. Devet amikrofilaremičnih uzoraka životinja i negativnih u razrjeđenju seruma/plazme 1/20 je odabrano za određivanje tzv., granične vrijednosti. Napravljena su serijska razrjeđenja uzoraka 1/1.25, 1/2.5, 1/5, 1/10, 1/20. Granična vrijednost je odabrana kao trostruko razrjeđenje zadnjeg pozitivnog razrjeđenja odabranih uzoraka seruma.

5. REZULTATI

5.1. Knottov test

Morfološki se mikrofilarije jednostavno prepoznaju kao duguljasti nitasti crvi, bijele boje, zaobljeni na prednjem kraju, zašiljeni na stražnjem kraju koje se postupno sužavaju od prednjeg kraja do stražnjeg kraja (Slika 1), te je tako od pretraženih 53 uzorka krvi metodom Knottovog testa pronađeno ukupno 18 pozitivnih uzoraka (Tablica 1).

Od 22 uzorka krvi iz veterinarske ambulante u Slavonskom Brodu pregledana modificiranom Knottovim testom jedan uzorak je bio pozitivan (4,5%), a 21 uzorak (95,5%) je bio negativan. Od 31 uzorka krvi vojnih pasa pozitivno je bilo 17 uzoraka (54,8%), a 14 uzoraka (45,2%) je bilo negativno. Uzorci krvi pristigli u svrhu pretrage na prisutnost antitijela protiv bičaša *Leishmania infantum* nisu analizirani Knottovim testom stoga što su bili dostupni samo serumi.

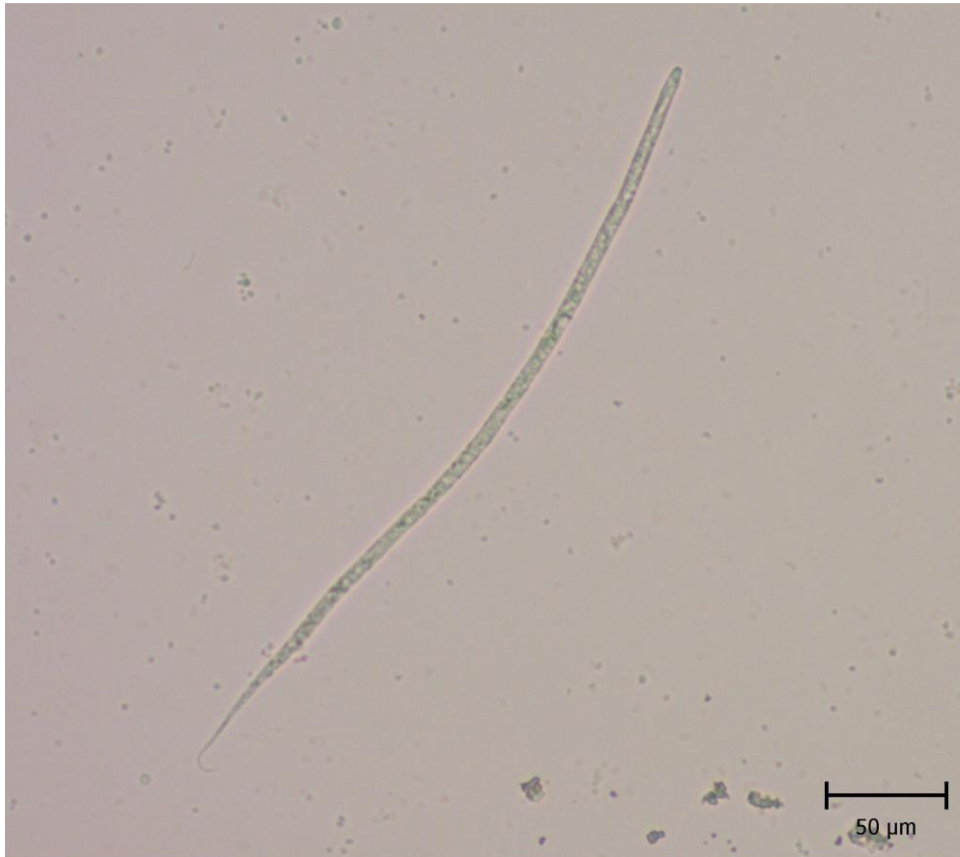
Tablica 1. Prikaz rezultata Knottovog testa

Skupina uzoraka	Knott-ov test	
	pozitivan	negativan
Slavonski brod	1 (4,5%)	21 (95,5%)
Uzorci krvi - <i>Leishmania</i>	NT*	NT*
Vojna policija	17 (54,8%)	14 (45,2%)

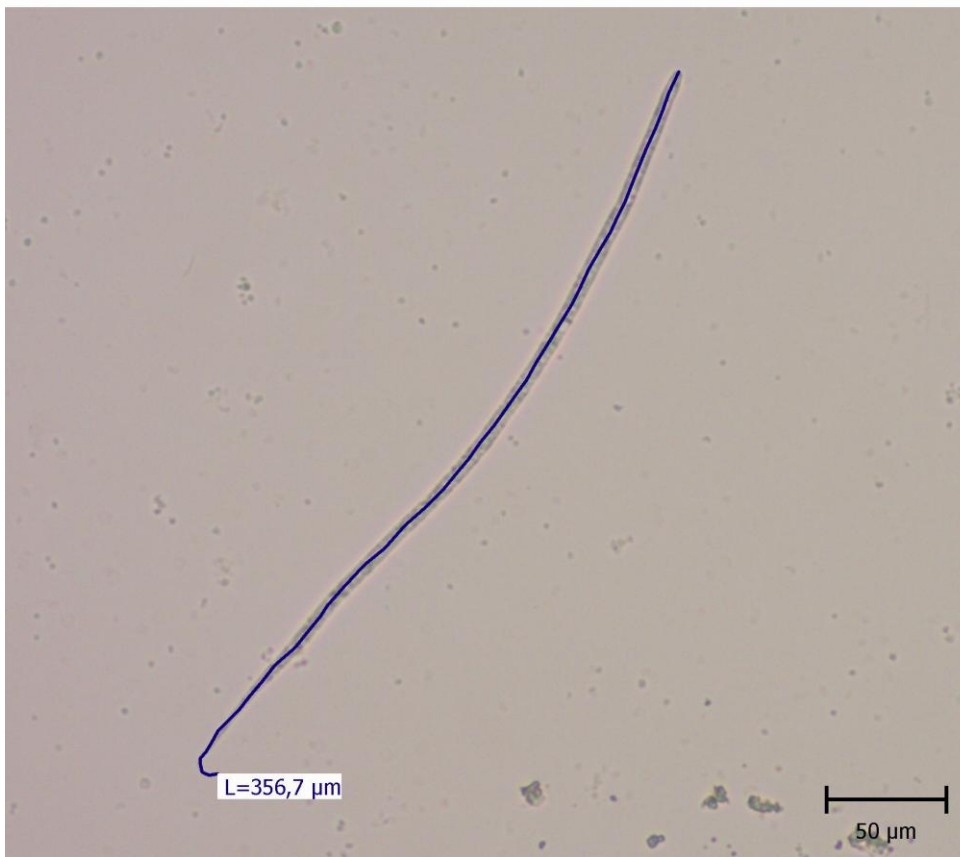
* nije testirano

5.2. Vrste mikrofilarija

Duljina tijela mikrofilarija mjerena je od prednjeg kraja pa sve do stražnjeg kraja tijela, zajedno s repićem (Slika 2). Na temelju duljine mikrofilarija svih pozitivno dobivenih rezultata, koja je varirala od 292,7 μm do 384,1 μm sa srednjom vrijednosti od 345,67 μm , utvrđeno je da se radi o vrsti *D. repens* (Tablica 2). Kao referentni uzorak *D. immitis* korišteni su arhivski uzorci mikrofilarija, izmjereni, te uspoređeni s dobivenim rezultatima za *D. repens* (Tablica 2). Prilikom pripreme antigena za indirektnu imunoflorescenciju nije korišten formalin te su tako izolirane mikrofilarije *D. repens* izmjerene i komparirane s mikrofilarijama izoliranim prilikom provođenja standardnog Knottovog testa (Tablica 2).



Slika 1. Prikaz mikrofilarije, koja se jednostavno prepoznaje kao duguljasti nitasti crv, zaobljen na prednjem kraju i zašiljen na stražnjem kraju tijela .



Slika 2. Prikaz načina mjerenja duljine tijela mikrofilarija (od prednjeg kraja pa sve do stražnjeg kraja tijela, zajedno s repićem).

Tablica 2. Prikaz rezultata mjerenja mikrofilarija

	Srednja vrijednost (μm)	Min (μm)	Max (μm)	Standardna devijacija uzorka (μm)
<i>D. repens</i>	345,6764228	292,7	384,1	17,03304927
<i>D. imitidis</i>	292,1487805	274,6	306,4	8,565603363
<i>D. repens</i> *	384,57	339,4	415,1	22,72706

* duljina tijela mikrofilarija mjerena nakon provođenja Knottovog testa bez formalina.

5.3. Brojnost mikrofilarija

Svakom mikrofilaremičnom psu je određen približan broj mikrofilarija u krvi koji je varirao od 2,5 do 3083,33 mikrofilarije (mf) /ml krvi. Rezultati za svaki uzorak su vidljivi u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz rezultata broja mikrofilarija/ml krvi.

UZORCI	KNOTT-ov test	BR. MF/ML
uzorak 1	+	2166,66 mf/ml
uzorak 2	-	
uzorak 3	+	2133,33 mf/ml
uzorak 4	+	1200 mf/ml
uzorak 5	+	1466,66 mf/ml
uzorak 6	+	12,5 mf/ml
uzorak 7	+	50 mf/ml
uzorak 8	+	366,66 mf/ml
uzorak 9	+	4,65 mf/ml
uzorak 10	-	
uzorak 11	+	2433,33 mf/ml
uzorak 12	+	1430 mf/ml
uzorak 13	+	1433,33 mf/ml
uzorak 14	+	7,69 mf/ml
uzorak 15	-	

uzorak 16	+	3083,33 mf/ml
uzorak 17	+	40 mf/ml
uzorak 18	+	2,5 mf/ml
uzorak 19	+	633,33 mf/ml
uzorak 20	-	
uzorak 21	+	16 mf/ml
uzorak 22	-	
uzorak 23	-	
uzorak 24	-	
uzorak 25	-	
uzorak 26	-	
uzorak 27	-	
uzorak 28	-	
uzorak 29	-	
uzorak 30	-	
uzorak 31	-	
uzorak 32	+	2500mf/ml

5.4. Prisutnost protutijela protiv mikrofilarija

Pozitivni uzorci su pokazali jasno membransko fluoresciranje žuto-zelene boje pri graničnom razrjeđenju 1/40 (Slika 3), a negativni uzorci nisu pokazali specifično fluoresciranje žuto-zelene boje, već nalaz crvene boje (Slika 4). Trostruko razrjeđenje zadnjeg pozitivnog razrjeđenja odabranih uzoraka seruma za ganičnu vrijednost je iznosilo 1/10, te je s time određena granična vrijednost u razrjeđenju 1/40. Od 63 uzorka seruma/plazme pregledana metodom imunoflouescencije (Tablica 4), 44 uzorka (69,8%) su bila pozitivna, a 19 uzoraka (30,2%) je bilo negativno.

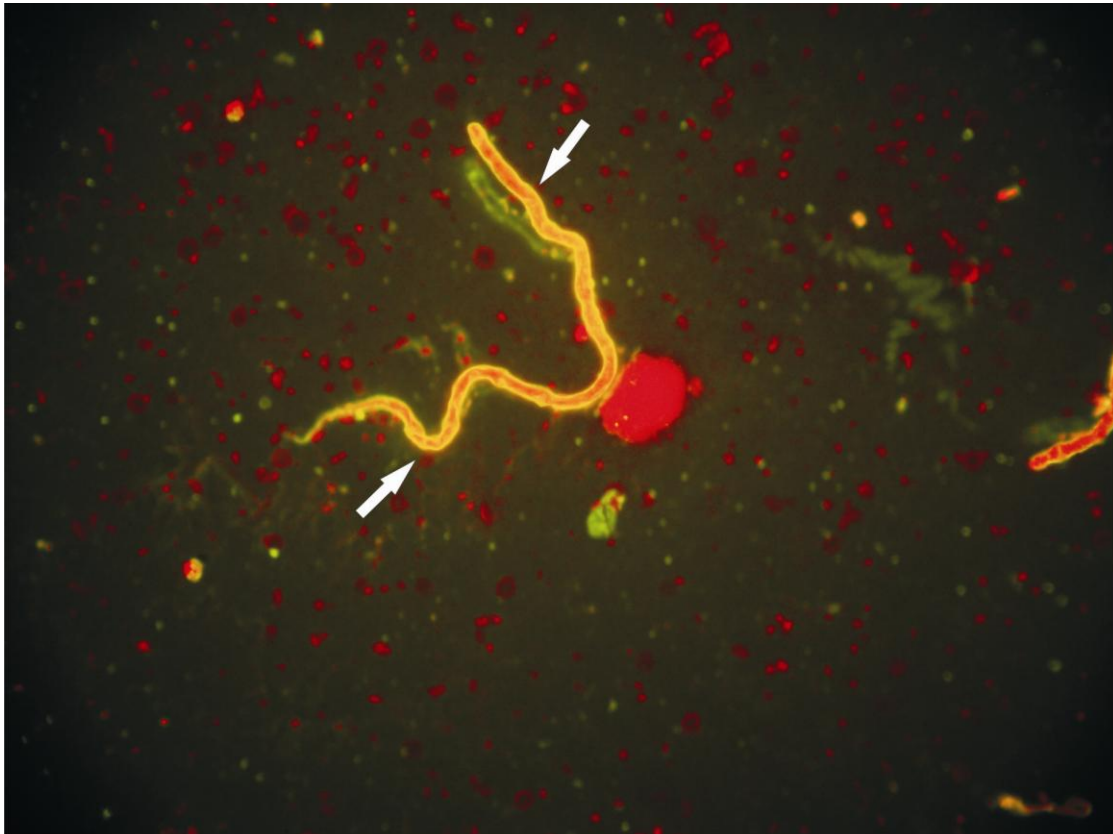
Od toga je pregledano 13 uzoraka iz Veterinarske ambulante u Slavonskom Brodu. Njih 9 (69,2%) su bili pozitivni pri razrjeđenju 1/40, a 4 uzorka (30,8%) negativna.

Od 19 *Leishmania* - uzoraka – 9 uzoraka (47,4%) je bilo negativno pri razrjeđenju 1/40, a 10 pozitivno (53,6%).

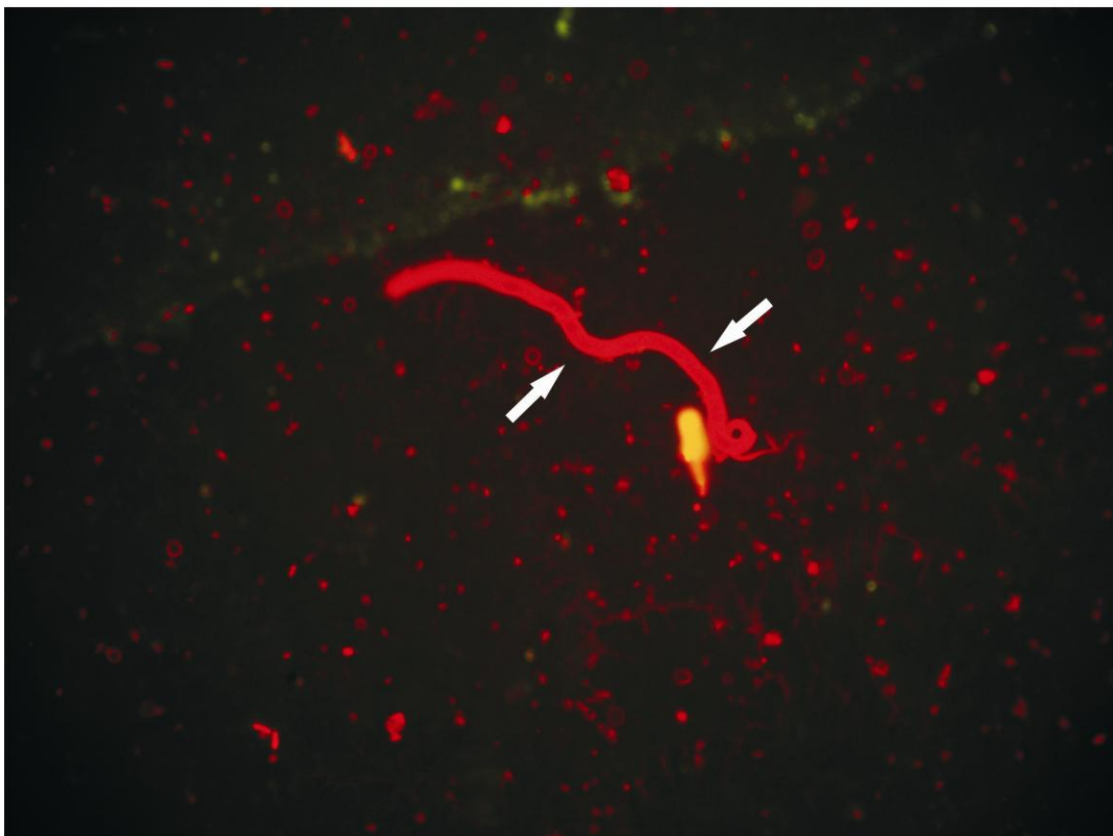
Od 31 uzorka krvi vojnih pasa 5 uzoraka (16,1%) je bilo negativno, a 26 pozitivno (83,9%).

Tablica 4. Prikaza rezultata pretraživanih seruma/plazme metodom indirektno imunofluorescencije.

Skupina uzoraka	indirektna imunofluorescencija	
	pozitivan	negativan
Slavonski brod	9 (69,2%)	4 (30,8%)
<i>Leishmania</i> - uzorci -	9 (47,4%)	10 (53,6%)
Vojna policija	26 (83,9%)	5 (16,1%)
Ukupno	44 (69,8%)	19 (30,2%)



Slika 3. Prikaz pozitivnog rezultata indirektno imunofluorescencije gdje se jasno vidi žuto-zeleno fluoresciranje membrane mikrofilarija (bijela strelica).



Slika 4. Prikaz negativnog rezultata indirektno imunofluorescencije gdje nema žuto-zelenog fluoresciranja membrane mikrofilarija (bijela strelica).

Prema anamnestičkim podacima o životinjama, tj. podacima o mjestu boravka životinja (izvan kuće ili uglavnom u kući) uspoređeni su nalazi Knottovog testa i indirektna imunofluorescencije (Tablica 5).

Tablica 5. Sveukupni komparativni prikaz rezultata indirektna imunofluorescencije, Knottovog testa s podacima o mjestu boravka životinja.

Skupina uzoraka	Knotov test (pozitivan/negativan)	Indirektna imunofluorescencija (pozitivan/negativan)	Mjesto boravka (izvan kuće/uglavnom u kući)
Slavonski brod	1/21	9/4	13/9
Uzorci - <i>Leishmania</i>	NT*	10/9	NT*
Vojna policija	17/14	26/5	31/0

* nije testirano

S obzirom da nije bilo moguće usporediti sve uzorke svim metodama zbog nedostupnosti anamnestičkih podataka i nedostupnosti uzoraka, uspoređen je samo jedan dio uzoraka koji su obrađeni svim metodama (Tablica 6, Tablica 7).

Tablica 6. Komparativni prikaz rezultata indirektna imunofluorescencije, Knottovog testa s podacima o mjestu boravka životinja.

Skupina uzoraka	Knotov test negativan	Indirektna imunofluorescencija ukupno (pozitivan/negativan)	Mjesto boravka	
			izvan kuće (pozitivan/negativan)	uglavnom u kući (pozitivan/negativan)
Slavonski brod	13	9/4	7/3	1/2
Vojna policija	14	11/3	11/3	0

U Tablici 7. su komparativno prikazani rezultati Knottovog testa i indirektna imunofluorescencije.

Tablica 7. Komparativni prikaz rezultata Knottovog testa i indirektna imunofluorescencije u vojnih pasa.

UZORCI	KNOTTOV test	BR. MF/ML	INDIREKTNA IMUNOFLUORESCENCIJA (1:40)
uzorak 1	+	2166,66 mf/ml	++
uzorak 2	-		++
uzorak 3	+	2133,33 mf/ml	++
uzorak 4	+	1200 mf/ml	++
uzorak 5	+	1466,66 mf/ml	++
uzorak 6	+	12,5 mf/ml	++
uzorak 7	+	50 mf/ml	++
uzorak 8	+	366,66 mf/ml	++
uzorak 9	+	4,65 mf/ml	++
uzorak 10	-		++
uzorak 11	+	2433,33 mf/ml	--
uzorak 12	+	1430 mf/ml	++
uzorak 13	+	1433,33 mf/ml	++
uzorak 14	+	7,69 mf/ml	++
uzorak 15	-		++
uzorak 16	+	3083,33 mf/ml	--
uzorak 17	+	40 mf/ml	++
uzorak 18	+	2,5 mf/ml	++
uzorak 19	+	633,33 mf/ml	++
uzorak 20	-		++
uzorak 21	+	16 mf/ml	++
uzorak 22	-		--
uzorak 23	-		++
uzorak 24	-		++
uzorak 25	-		++
uzorak 26	-		--
uzorak 27	-		++
uzorak 28	-		++
uzorak 29	-		++
uzorak 30	-		--
uzorak 31	-		++

6.RASPRAVA

U pasa mogu oblići roda *Dirofilaria* preživjeti godinama, a ženke producirati mikrofilarije koje cirkuliraju krvlju (mikrofilaremična ili patentna invazija). U nekim slučajevima nema mikrofilarija (amikrofilaremična ili latentna invazija, te se ta situacija objašnjava kao posljedica različitih razloga kao što su npr., invazija jednim adultom ili adultima istog spola, starošću adulata te imunosnim odgovorom nosioca.

Dokazan broj mikrofilaremičnih pasa Knott-ovim testom iz Slavenskog Broda (Tablica 5) upućuje na to da se broj invadiranih pasa na ovom području nije povećao u usporedbi s istraživanjem provedenom u Valpovu gdje su bila dva uzorka krvi pozitivna (VECL i ŽIVIČNJAK, 2007.). Povećan broj mikrofilaremičnih vojnih pasa (Tablica 7) je povezan s područjem na kojem se kreću, odnosno obučavaju psi. Vojni psi se obučavaju po šumama, gdje je visoka prisutnost vektora (komaraca). Ukupan broj mikrofilaremičnih pasa u ovom istraživanju upućuje na veću prevalenciju u usporedbi prema istraživanju ŽIVIČNJAK i sur. (2007) kada je 15,5% pasa, koji su bili klinički zdravi, bilo mikrofilaremično. Dobiveni rezultati ovog istraživanja su bili i očekivani s obzirom na klimatske uvjete i prirodne nepogode koje su prošle godine zadesile dijelove naše zemlje, što je pogodovalo većoj populaciji komaraca. To se slaže s dosadašnjim istraživanjima koji upućuju da broj komaraca najviše ovisi o vlažnosti godine te o samom geografskom području (SUDARIĆ BOGOJEVIĆ i sur., 2009). U istraživanju je morfološki dokazana prisutnost *D. repens* (Tablica 2) što je bilo i za očekivati, ako se usporede dosadašnja istraživanja prema kojem je *D. repens* bila zastupljena u cijeloj Hrvatskoj, a *D. immitis* samo na području Istre i Dubrovnika (ŽIVIČNJAK i sur., 2007). Temeljem testiranja destilirane vode umjesto formalina u detekciji mikrofilarija, otvorila se mogućnost primjene iste u pripremi Knottovog testa. Iako se čini destilirana voda kao izvrsna i netoksična zamjena za formalin, treba obratiti pozornost da su u tome slučaju mikrofilarije nešto duže.

Prisutnost protutijela i protiv adulata i protiv mikrofilarija je najveći u latentnoj fazi invazije. Kako raste broj mikrofilarija u krvi, tako opada količina protutijela, tj. kako opada broj mikrofilarija, količina protutijela i protiv adulata i mikrofilarija raste (TAMASHIRO i sur., 1985). To je potvrđeno i u ovom istraživanju, naime dva uzorka koja su sadržavala visok broj mikrofilarija (2433,33mf/ml, 3083,33mf/ml: Tablica 7) bila su negativna indirektnom imunofluorescencijom. Za očekivati je da će te životinje nakon terapije mikrofilaricidom biti

seropozitivne (TAMASHIRO i sur., 1985), no za to je potrebno kliničko praćenje tih životinja.

Visok broj seropozitivnih pasa dokazan indirektnom imunofluorescencijom iz Slavenskog Broda i vojnih pasa u usporedbi s negativnim Knottovim testom (Tablica 6) ukazuje na to da su psi bili izloženi, tj. u kontaktu s vektorima što je i očekivano s obzirom da je Slavonski Brod mjesto uz rijeku Savu gdje je veći broj komaraca zbog dobrih klimatskih prilika za njihov razvoj. Amikrofilaremični, a seropozitivni psi su vrlo vjerojatno bili u prepatentnom periodu ili u latentnoj fazi invazije, što bi se moglo dokazati jedino daljnjim kliničkim praćenjem istih životinja.

U svakom slučaju, bitno je za napomenuti da su Knottov test i indirektna imunofluorescencija dvije metode koje nadopunjuju jedna drugu te bi se mogle koristiti u rutinskoj dijagnostici dirofilarioze.

Iako indirektna imunofluorescencija nije u upotrebi kao metoda dijagnostike, ona daje uvid u izloženost pasa antigenima nematoda *D. repens* i *D. immitis*, s obzirom da su to jedine dvije vrste filarida na našem području, a dijele zajedničke antigene determinante koje prepoznaju protutijela IgG razreda (OLEAGA i sur., 2009; GONZÁLEZ-MIGUEL i sur., 2010). Specifičnost indirektna imunofluorescencije bazirane na kutikularnim antigenima mikrofilarija *D. immitis* je prema prijašnjim istraživanjima iznosila 100%. Naime, autori su testirali uzorke seruma životinja invadiranih s metiljima, trakavicama, nematodima (*Trichuris vulpis*, *Toxascaris* sp., *Toxocara* sp.), i kokcidijama (*Isospora* sp.), ali ne i serume životinja invadiranih s *D. repens* (SISSON i sur., 1985). Do sada nema nikakvih literaturnih podataka o serološkoj dijagnostici *D. repens* primjenom metode indirektna imunofluorescencije i mikrofilarija kao izvora antigena. S kojom je vrstom *Dirofilaria* pas invadiran, nažalost ne može se serološki zaključiti temeljem indirektna imunofluorescencije zbog unakrižnih reakcija između te dvije vrste, već vrsno specifičnim testovima baziranim na specifičnim proteinima.

Invazijski oblik *Dirofilaria* sp. za psa je L3, koja se dalje razvija do adulta. Ako se životinja nalazi u prepatentnom periodu (još uvijek amikrofilaremičnom) ona reagira protutijelima protiv mikrofilarija iako nikad nije došla u kontakt s njima. Naime, protutijela IgG razreda prepoznaju zajedničke antigene determinante za oba razvojna oblika jer i adulti i mikrofilarije *D. immitis* posjeduju zajedničke proteine: aktin, gliceraldehid -3- fosfat dehidrogenaza,

galektin, fruktoza-bis-fosfat aldolaza te stresne proteine 60 i 70 (SASSI i sur, 2014). Zbog zajedničkih antigenih determinanti *D. repens* i *D. immitis*, te različitih razvojnih stadija unutar iste vrste, indirektna imunofluorescencija bazirana na kutikularnom antigenu mikrofilarija je izvrsna alternativna metoda dijagnostike za otkrivanje kontakta i/ili invadiranosti pasa s istim oblicima. Isto tako, važni je za naglasiti da protutijela IgG razreda protiv *D. immitis* i *D. repens* u ljudi također prepoznaju zajedničke proteinske determinante (GONZÁLEZ-MIGUEL i sur., 2010), te s time također pružaju mogućnost upotrebe te metode dijagnostike i u humanoj medicini što bi bilo vrijedno za istražiti.

Od 1885. do 2000. godine zabilježeno je 782 slučaja u više od 37 država svijeta od čega je u Europi najviše slučajeva zabilježeno u Italiji (289), Rusiji (83), Francuskoj (76), Grčkoj (27), Turskoj (18) i Mađarskoj (11) (HOLLER i sur., 2010).

Bolest nije zaobišla niti Hrvatsku u kojoj su prvi slučaj opisali BUJGER i sur. (1996). Od tada BEZIĆ (2009) u literaturi pronalazi najmanje desetak potvrđenih slučajeva bolesti uzrokovanih s *D. repens*, što Hrvatsku, poput drugih zemalja Mediterana, čini endemičnim dirofilarioznim područjem (HOLLER i sur., 2010). Iako je viša prevalencija *D. immitis* u pasa na određenim područjima, većina slučajeva bolesti u ljudi uzrokovana je s *D. repens*. U Hrvatskoj do sada nije zabilježen niti jedan slučaj pulmonalne dirofilarioze u ljudi uzrokovan s *D. immitis*.

Zaključno, dobivene spoznaje o izloženosti (mikrofilaremični i seropozitivni psi) *D. repens* u pasa ukazuju na povećan oprez s obzirom da *D. repens* ima određeni zoonotski potencijal. Poželjno bi bilo da se takve životinje klinički prate i liječe u slučaju pojave mikrofilarija u krvi te s time drže pod kontrolom kao potencijalni izvor invazije za ljude.

7. ZAKLJUČCI

- Zbog izloženosti vektorima, veći je postotak invadiranih životinja koje borave na otvorenom.
- Za pripremu metode Knottovog testa, umjesto formalina, može poslužiti netoksična destilirana voda, pri čemu treba obratiti pozornost na dužinu mikrofilarija.
- Invazija *D. repens* se može dokazati metodom indirektne imunofluorescencije.
- Kombinacija metoda Knottovog testa i indirektne imunofluorescencije bi mogle poslužiti u rutinskoj dijagnostici dirofilarioze.
- Zbog dokazane visoke izloženosti pasa obliću *D. repens*, trebalo bi obavezno klinički pratiti seropozitivne pse i liječiti u slučaju pojave mikrofilarija u krvi kako bi se spriječila mogućnost invazije ljudi koji žive zajedno s njima.

8. LITERATURA

- ANONYMUS (2015): Dirofilarioza je bolest pasa i rjeđe mačaka uzrokovana srčanim parazitom *Dirofilaria immitis*. <http://www.veinst.hr/aktualnosti/210-dirofilarioza-je-bolest-pasa-i-rjee-maaka-uzrokovana-sranim-parazitom-dirofilaria-immitis>
- ARANDA C., O. PANYELLA, R. ERITJA, J. CASTELLA (1998): Canine filariasis: Importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). *Vet. Parasitol.* 77, 267-275.
- BEZIĆ J. (2009): Human dirofilariasis in Croatia. *Acta Dermatovenerol. Croat.* 17, 82-83.
- BUJGER Z., M. EKERT, M. TOJAGIĆ, M. ČAČIĆ, J. GRANIĆ (1996): *Dirofilaria conjunctivae*. *Ophthalmol. Croat* 5, 63-66.
- CARLETON R. E., M. K. TOLBERT (2004): Prevalence of *Dirofilaria immitis* and gastrointestinal helminths in cats euthanized at animal control agencies in northwest Georgia. *Vet. Parasitol.*, 119, 319-326.
- DEMIASKIEWICZ A. W., G. POLANCZYK, B. OSINSKA, M. PYZIELA, I. KULIGOWSKA, J. LACHOWICZ, A. SIKORSKI, W. STEFANSKI (2014): The prevalence and distribution of *Dirofilaria repens* in dogs in the Masovian Province of Central-Eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 21, 701–704.
- ĐORĐEVIĆ J., S. TASIĆ, N. MILADINOVIĆ-TASIĆ, A. TASIĆ (2010): Diagnosis and Clinical Importance of Human Dirofilariosis. *Acta Fac. med. Naiss.* 27, 81-84.
- GENCHI C., L. RINALDI, G. CRINGOLI (2007): *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. Free Communications presented at the First European *Dirofilaria* Days (Zagreb, Croatia). First edition. February 22-25, 41-125.
- GONZÁLEZ-MIGUEL J., L. ROSARIO, E. ROTA-NODARI, R. MORCHÓN, F. SIMÓN (2010): Identification of immunoreactive proteins of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* recognized by sera from patients with pulmonary and subcutaneous dirofilariosis. *Parasitol. Int.* 59, 248-256.
- GRIEVE R. B., D. H. KNIGHT (1985): Anti-*Dirofilaria immitis* antibody levels before and after anthelmintic treatment of experimentally infected dogs. *J. Parasitol.* 71, 56-61.
- GUERRERO J. (2005): Prevention and Treatment of Dirofilariosis Revisited in 2005. Proceedings of the 30th World Congress of the World small animals Veterinary Association, May 11-14, Mexico city, Mexico.

- HOLLER D., A. RACZ, J. BOŠNIR, O. PETRAK (2010): The prevalence of dirofilariasis in the hinterland of the Istrian peninsula. *Med. Jad.* 40, 67-74.
- LEPAN ŠTEFANČIĆ S. (2015): Komarci prenose crve koji se šecu pod kožom. *Večernji list*. 11.03.2015., <http://www.vecernji.hr/hrvatska/komarci-prenose-crve-koji-se-secu-pod-kozom-994288>
- MAZURKEVICH A., N. VASYLYK, T. AVRAMENKO, S. VELICHKO, W. TARELLO, E. VARODI (2004): Adult *Dirofilaria repens* nematodes in a cat from Kiev, Ukraine. *Vet. Rec.* 155, 638-639.
- OLEAGA A., R. PÉREZ-SÁNCHEZ, E. PAGÉS, C. MARCOS-ATXUTEGI, F. SIMÓN (2009): Identification of immunoreactive proteins from the dog heartworm (*Dirofilaria immitis*) differentially recognized by the sera from dogs with patent or occult infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 166, 134-141.
- ÖNCEL T., G. VURAL (2005): Seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in Stray Dogs in Üstanbul and Üzmir. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 29, 785-789.
- OTRANTO D., F. DANTAS-TORRES, E. BRIANTI, D. TRANVERSA, D. PETRIĆ, C. GENCHI, G. CAPELLI (2013): Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasite Vector* 6, 16.
- PAMPIGLIONE S., S. RIVASI, A. GUSTINELLI (2008): *Dirofilaria* human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: a critical analysis. *Histopathology*, 54, 192-204.
- SASSI A. J., J. F. GEARY, L. P. LEROUX, A. R. MOORHEAD, M. SATTI, C. D. MACKENZIE, T. G. GEARY (2014): Identification of *Dirofilaria immitis* proteins recognized by antibodies from infected dogs. *J. Parasitol.* 100, 364-367.
- SAEVIK B. K., E. JÖRUNDSSON, T. STACHURSKA-HAGEN, K. TYSNES, H. BRUNHANSEN, H.C. WIKSTRÖM, L.J. ROBERTSON (2014): *Dirofilaria repens* infection in a dog imported to Norway. *Acta Vet. Scand.*, 56, 6.
- SISSON D., G. DILLING, M. M. WONG, W. P. THOMAS (1985): Sensitivity and specificity of the indirect-fluorescent antibody test and two enzyme-linked immunosorbent assays in canine dirofilariasis. *Am. J. Vet. Res.* 46, 1529-1533.

- SUDARIĆ BOGOJEVIĆ M., E. MERDIĆ, N. TURIĆ, Ž. JELIČIĆ, Ž. ZAHIROVIĆ, I. VRUĆINA, S. MERDIĆ (2009): Seasonal dynamics of mosquitoes (Diptera:Culicidae) in Osijek (Croatia) for the period 1995-2004. *Biologia* 64, 760-767.
- TAMASHIRO W. K., K. G. POWERS, D. A. LEVY, A. L. SCOTT (1985): Quantitative and qualitative changes in the humoral response of dogs through the course of infection with *Dirofilaria immitis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 292-301.
- TAMASHIRO W. K., M. S. IBRAHIM, D. A. MORAGA, A. L. SCOTT (1989): *Dirofilaria immitis*: studies on anti-microfilarial immunity in Lewis rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 368-376.
- VECL L., T. ŽIVIČNJAK (2007): Appliance of the modiflicated Knott's test in microfilariaemia detection in the dogs in town of Valpovo. Proceedings of the First European Dirofilaria Days, FEDD, 22-25.02.2007, Zagreb, Hrvatska, 38.
- ŽIVIČNJAK T., F. MARTINKOVIĆ, R. BECK (2007): Canine dirofilariosis in Croatia: Let's face it. Proceedings of the First European Dirofilaria Days, FEDD, 22-25. 02.2007, Zagreb, 35.

9. SAŽETAK

IZLOŽENOST PASA OBLIĆIMA *DIROFILARIA* SP.

Ana Aračić
studentica 6. godine

Dirofilaria repens i *Dirofilaria immitis* su nitasti crvi roda *Dirofilaria* koji parazitiraju u mesojeda, a mogu se naći i u ljudi. Adulti *D. immitis* se u većini slučajeva nalaze u srcu i pulmonarnim arterijama, a *D. repens* u potkožju. Najveći broj invadiranih pasa su asimptomatski nositelji parazita tako da se dijagnoza dirofilarioze u većini slučajeva postavlja slučajno. Cilj ovog istraživanja je bilo utvrditi prisutnost i vrstu mikrofilarija *Dirofilaria* sp., prisutnost protutijela u istih pasa te dobivene nalaze međusobno usporediti kako bi se dobio uvid u stvarno stanje životinja koje su bile u kontaktu s oblicima *Dirofilaria* sp. Modificiranim Knott-ovim testom je dokazana prisutnost mikrofilarija, njihovim mjerenjem je utvrđena vrsta *D. repens*, a indirektnom imunoflouescencijom i prisutnost protutijela protiv mikrofilarija u pasa. Rezultati ovog istraživanja su pokazali višu seroprevalenciju od prevalencije mikrofilaremičnih pasa te višu seroprevalenciju od invadiranih životinja koje borave vani.

Ključne riječi: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, Knott-ov test, indirektna imunoflouescencija

10. SUMMARY

CANINE EXPOSURE TO *DIROFILARIA* SP NEMATODES

Ana Aračić

6th year student

Dirofilaria repens and *Dirofilaria immitis* are nematode worms belonging to *Dirofilaria* genus which are mainly parasites of carnivores, but could be found in humans as well. *D. immitis* adults can be found mainly in heart and pulmonary arteries and *D. repens* in subcutaneous tissue. Most of the infected dogs are latent carrier of the parasite so final *Dirofilaria* infection is confirmed in most cases accidentally. The aim of this study was to determine microfilaria presence, microfilaria species and antibody presence which will show the real state of *Dirofilaria* sp. infested animals. The presence of microfilaria was proven with modified Knott's test, their measurements revealed *D. repens* species and antibody prevalence with indirect immunofluorescence antibody test. The results of this survey showed higher seroprevalence than microfilaria prevalence in the same dog population. Higher prevalence was also in animals that spend most of their lives outside the house.

Ključne riječi: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, Knott's test, indirect immunofluorescence.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 04.09.1992. u Slavonskom Brodu. Pohađala sam osnovnu školu „Blaž Tadijanović“ nakon koje sam upisala Klasičnu gimnaziju „fra Marijana Lanosovića“. 2011. godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija bila sam demonstratorica na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom. Osim toga, volontirala sam u veterinarskim ambulancama: „Veterinar d.o.o.“ i „Praxis-vet“ u Slavonskom Brodu.