

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Gabriel Kontrec

Diferencijalna krvna slika kokoši lake pasmine nakon terapije  
tekuti pripravkom fluralaner

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

NAZIV ZAVODA:

Zavod za bolesti peradi s klinikom i Zavod za fiziologiju i radiologiju Veterinarskog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu,

PREDSTOJNIK:

Zavod za bolesti peradi s klinikom: izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Zavod za fiziologiju i radiologiju: prof. dr. sc. Marinko Vilić

MENTORI:

Izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein

Prof. dr. sc. Jasna Aladrović

ČLANOVI POVJERENSTVA ZA OBRANU DIPLOMSKOG RADA:

1. doc. dr. sc. Lana Pađen
2. izv. prof. dr. sc. Željko Gottstein
3. prof. dr. sc. Jasna Aladrović
4. dr. sc. Liča Lozica (zamjena)

## ZAHVALA

Prije svega, želio bih se zahvaliti svojem mentoru, izv. prof. dr. sc. Željku Gottsteinu što mi je pomogao izabrati ovu temu te izraditi diplomski rad.

Nadalje bih se želio zahvaliti prof.dr. sc. Jasni Aladrović na pomoći i usmjeravanju prilikom pisanja ovog rada.

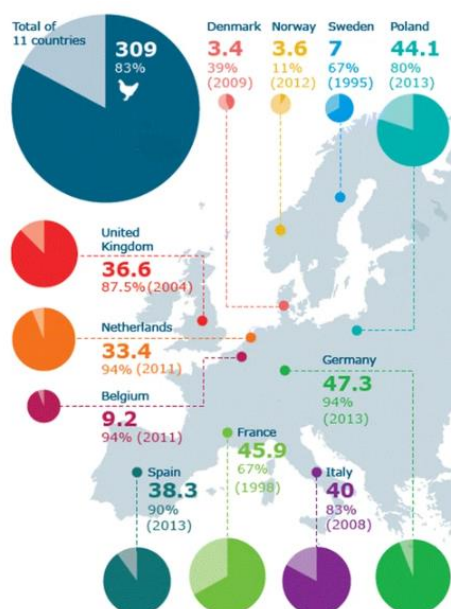
Također bih se želio zahvaliti svojoj obitelji, prijateljima i kolegama što su bili uz mene i pomagali mi.

## SADRŽAJ:

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature .....	3
2.1. Klasifikacija i razvojni ciklus tekući.....	3
2.2. Utjecaj na zdravlje peradi.....	4
2.3. Kontrola i terapija tekući .....	4
3. Materijali i metode.....	6
3.1. Kokoši praćene u istraživanju .....	6
3.2. Antiparazitik korišten u istraživanju .....	6
3.3. Uzorkovanje krvi.....	6
3.4. Analize .....	6
3.4.1. Utvrđivanje ukupnog broja leukocita .....	6
3.4.2. Određivanje diferencijalne krvne slike .....	7
3.5. Statistička analiza.....	7
4. Rezultati .....	8
5. Rasprava.....	10
6. Zaključci.....	12
7. Literatura .....	13
8. Sažetak.....	17
9. Summary .....	18
10. Životopis .....	19

# 1. UVOD

Tekuti predstavljaju jednu od najučestalijih i najvažnijih ektoparazitoza u intenzivnom uzgoju peradi. Opisane su različite vrste tekuti, ali je u svijetu najučestlija kokošja tekut (*Dermanyssus gallinae*). Invazija ovom vrstom neposredno ugrožava životinjsko zdravlje, ali i posredno kao prijenosnik bolesti (MORO i sur., 2005.; MORO i sur., 2009.; GEORGE i sur., 2015.) te time narušava dobrobit i direktno utječe na proizvodnost kokoši. Prema nekim epidemiološkim istraživanjima prevalencija *D. gallinae* na europskim farmama može doseći i >90% (WAAP i sur., 2019.) (Slika 1).



Slika 1. Broj kokoši nesilica po državama u milionima i postotak farmi infestiranih s *Dermanyssus gallinae*. (preuzeto iz GEORGE i sur., 2015.)

Kokošja tekut, osim peradi, može invadirati i druge vrste ptica te sisavce, poput pasa, glodavaca i čovjeka te uzrokovati gamazoidozu (SIGOGNAULT FLOCHLAY i sur., 2017.; SIOUTAS i sur., 2021.). Najčešće se pronalaze u toplijim područjima, pogotovo u peradnjacima s prečkama (BIĐIN, 2008.). Zadržavaju se u pukotinama te tijekom noći, svakih 2 do 4 dana, izlaze kako bi se hranile s kokošjom krvlju (KILPINEN, 2005.). Tekut je hematofagni parazit koji zahtjeva krv kako bi prošla kroz zadnja tri stadija svojeg razvojnog ciklusa te kako bi proizvela jajašca za vrijeme ovipozicije. Ako dođe do jakih invazija na jednoj

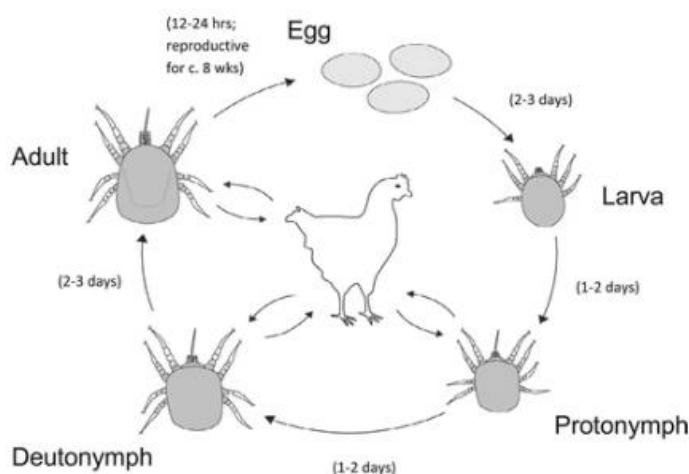
jedinci može se pronaći 20 do 500 tisuća tekuti u različitim stadijima razvoja. Kod takvih invazija može doći do razvoja dermatitisa, anemije, iritacije kože koja je često popraćena svrbežom te nemirom jedinke i stresom, što sve uzrokuje narušavanje dobrobiti (KOWALSKI i SOKOL, 2005.; SIGOGNAULT FLOCHLAY i sur., 2017.). Navedene promjene posljedično dovode do uginuća kokoši, gubitaka uzrokovanih bolestima i pada proizvodnje jaja (DECRU i sur., 2020.).

Dugogodišnja primjena različitih sintetičkih akaricida dovela je do nastajanja rezistencije tekuti i smanjivanja njihove učinkovitosti (BEUGNET i sur., 1997.; SPARAGANO i sur., 2014.). Zbog toga je u zadnjih desetak godina došlo do istraživanja i razvoja novih i učinkovitijih pripravaka i metoda kontrole i uklanjanja tekuti na farmama (GOTTSTEIN i sur., 2022.). Danas se koriste različiti pripravci poput bioloških akaricidnih preparata, cjepiva na temelju esencijalnih komponenti antikoagulanskih sekreta, esencijalnih ulja, mineralnih pripravaka u obliku praha, fizikalnih postupaka kao što su električna struja, toplina, prašina i sl. (BUDICIN, 2021.; GOTTSTEIN i sur., 2022.). Navedeni pripravci nisu se pokazali uspješnima u intenzivnoj proizvodnji prilikom terapije tekuti, stoga se u terapiji počinje koristiti pripravak na bazi fluralanera (Exzolt, MSD). On se može koristiti na velikom broju jedinki primjenom kroz pitku vodu, a bez karence za konzumiranje jaja. Primjenom antiparazitne terapije očekuje se oporavak životinje. Dinamiku oporavka nakon tretiranja tekuti moguće je pratiti putem promjena krvne slike. Cilj ovog istraživanja je utvrditi učinak aplikacije fluralanera (Exzolt, MSD) na diferencijalnu krvnu sliku prije i nakon terapije kokoši nesilica lake linije Lohmann Brown u konvencionalnoj proizvodnji.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. KLASIFIKACIJA I RAZVOJNI CIKLUS TEKUTI

Kokošja tekut (*Dermanyssus gallinae*) pripada redu Mesostigmata unutar kojeg se nalazi veliki broj tekuti koje se međusobno razlikuju morfološki i ponašanjem. Odrasle jedinke su dugačke 0.75-1 mm i imaju sivo-bijelo tijelo s dugačkim nogama, koje postaje smeđe-crveno nakon hranjenja krvlju (SPARAGANO i sur., 2011.). Mnoge vrste su fitofagi ili saprofagi, dok drugi, uključujući i kokošju tekut, žive kao obligatni paraziti (PRITCHARD i sur., 2015.). *D. gallinae* se zadržava u područjima visoke vlage (najmanje 70%), dok slabo preživljava u suhim područjima zbog loše sposobnosti zadržavanja vlage. Tekut je zaštićena hitinskim egzoskeletom. Egzoskelet se dijeli na dorzalni, koji prekriva cijelo tijelo i nije spolno specifičan i ventralni, koji se kod ženki dijeli na genitoventralni štit, koji se proteže posteriorno od drugog para nogu, i analni štit, dok se kod mužjaka nalazi samo ventralni štit (DI PALMA i sur., 2012.). Egzoskelet štiti tekut od gubitka vode te od vanjskih oštećenja. Tekut je hematofagni ektoparazit peradi i drugih ptica (KRISTOFÍK i sur., 1996.; BRÄNNSTRÖM i sur., 2008.). Razvojni ciklus tekuti ima pet stadija, od jajašca preko ličinke, protonimfe, deutonimfe te stadija odrasle tekuti (PRITCHARD i sur., 2015.; GEORGE i sur., 2015.) (Slika 2). Zadnja tri stadija hrane se krvlju kako bi prošli kroz čitav razvojni ciklus.



Slika 2. Životni ciklus parazita *Dermanyssus gallinae*. (preuzeto iz GEORGE i sur., 2015.).

Razvojni ciklus u prosjeku traje oko 14 dana, no u slučaju da je vlažnost zraka oko 80% i temperatura između 25 i 35 °C, ciklus traje 5,5 do 7 dana što može dovesti do eksponencijalnog rasta populacije (SPARAGANO i GIANGASPERO, 2011.). Krvlju se dominantno hrane ženke nekoliko puta za vrijeme svojeg života, no zabilježeni su slučajevi gdje su se i mužjaci intermitentno hranili krvlju (PRITCHARD i sur., 2015.). Za vrijeme parazitiranja ženka može usisati i do 200 µg krvi.

## 2.2. UTJECAJ NA ZDRAVLJE PERADI

Mlađe jedinke peradi su najpodložnije invazijama, no najprisutnije su invazije u objektima s dugim proizvodnim tijekom, poput rasplodnih jata i jata konzumnih nesilica. Prisutnost tekuti na farmama dovodi do visoke razine stresa kod peradi. Stres je izazvan boli i iritacijama kože uzrokovanim kontinuiranim ubodima tekuti. Uz to, invazije tekuti dovode do pojave agresivnog ponašanja, kljucanja perja drugih jedinki, kanibalizma i povećanog unosa vode i hrane. Zamijećeno je i pojačano samočišćenje koje je simptom stresa. Kod jedinki koje su invadirane tekutima dolazi do povećanja razine kortikosterona za 150% i smanjenja gamaglobulina za 22% što ukazuje na imunosupresiju. Razine adrenalina su također dvostruko povišene u invadiranim jedinki nego kod kontrolne skupine (KOWALSKI i SOKOL, 2005.). Tekut može i neizravno utjecati na zdravlje peradi, kao vektor za različite virusne i bakterijske bolesti poput boginja, salmoneloze, ptičjih spiroheta i bakterije *Erysipelothrix rhusiopathiae* (CHIRICO i sur., 2003.).

## 2.3. KONTROLA I TERAPIJA TEKUTI

Kontrola invadiranosti se provodi postavljanjem zamki u razmaku od 2 do 3 dana (MUL i sur., 2009.). Same zamke su načinjene od kartonskih valjaka poput ostataka od role toaletnog papira ispunjenih zgužvanim listovima toaletnog papira. Nakon toga zamke se postavljaju u objekt na skrivenim mjestima na kojima se očekuje nakupljanje tekuti, a do kojih ne mogu doći kokoši. Zamke se skupljaju sljedeći dan nekoliko sati nakon paljenja svjetla te se pojedinačno odlažu u najlonske vrećice i zamrzavaju na -20 °C do mjerenja. Količina tekuti po zamci se mjeri vaganjem na analitičkoj vagi. Kontrola invadiranosti se uobičajeno provodi prije i potom poslije primjene pripravka s ciljem provjere učinkovitosti.

Trenutačno se u suzbijanju tekuti najviše koristi komercijalni pripravak Exzolt (MSD), čija je djelatna tvar fluralaner. Fluralaner je inhibitor dijelova živčanog sustava artropoda s antagonističkim djelovanjem na receptore gamaaminomaslačne kiseline i receptore za



glutamat. Početak djelovanja Exzolta nastupa za 4 sata od kada se tekut počela hraniti na tretiranim kokošima, tekut ugiba, a kod ženki se zaustavlja proizvodnja jajašaca na 15 dana od prve primjene Exzolta. Pripravak se prema uputama proizvođača stavlja u vodu za piće u dozi od 0,5 mg fluralanera po kilogramu tjelesne mase, što odgovara 0,05 ml proizvoda. Daje se u dvije doze primijenjene u razmaku od 7 dana. Za potpuni terapijski učinak potrebno je primjeniti pripravak na opisani način. U slučaju da je indiciran i drugi ciklus tretiranja, vremenski interval između dva ciklusa treba biti najmanje 3 mjeseca.

Primjenu fluralanera u vodi za piće u navedenoj dozi perad dobro podnosi, a preparat ima visoku sigurnosnu granicu do ukupne doze 15 puta veće od preporučene u zdravih odraslih kokoši nesilica (PROHACZIK i sur., 2017.). Učinkovitost fluralanera je od 95,3 do 99,8% tri dana i od 97,8 do 100% devet dana nakon primjene. Učinkovit je iznad 90% 56 do 238 dana nakon početka tretiranja (THOMAS i sur., 2017.). Na temelju rezultata PROHACZIK i sur. (2017.) i THOMAS i sur. (2017.), očekuje se da primjena antiparazitika na bazi fluralanera koji se daje putem vode za piće, neće imati negativan utjecaj na kvalitetu i proizvodnju jaja.

Primjena Exzolta utječe na promjenu hematoloških parametara. PETERSEN i sur. (2021.) su utvrdili porast broja crvenih krvnih stanica i vrijednosti hematokrita 42 dana nakon primjene fluralanera. U istraživanju BUDICINA (2021.) ukupan broj eritrocita se postepeno smanjuje do 60. dana od početka tretiranja, no ostaje unutar fizioloških granica. Prilikom jake invazije tekutima dolazi do aktivacije kompenzatornih mehanizama zbog kojih dolazi do pojačanog stvaranja i otpuštanja eritrocita s ciljem da se nadoknadi gubitak. Nakon terapije i smanjenja broja tekuti dolazi do prestanka povećane proizvodnje eritrocita te njihov broj u krvi opada. Ukupan broj leukocita je najveći na početku tretiranja zbog traumatizacije tkiva uzrokovanih ubodima tekuti, stresa i posljedičnog razvoja sistemske upale. Nakon terapije broj leukocita opada što se može primjetiti već 7. dan. (BUDICIN, 2021.). Vrijednost hematokrita je u prva dva tjedna od početka tretiranja naglo porasla što je vjerojatno posljedica smanjenja broja tekuti u jatu, no do 60. dana se ponovo vratila na istu razinu kao i prije tretiranja (GOTTSTEIN i sur., 2021.). Vrijednosti hemoglobina su naglo porasle s početkom terapije peradi, no za razliku od hematokrita njihova vrijednost je ostala na visokim razinama do 60. dana mjerenja (BUDICIN, 2021.).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. KOKOŠI PRAĆENE U ISTRAŽIVANJU

U istraživanje je uključeno 2000 kokoši nesilica lake linije, Lohmann Brown, držane slobodno u volijerama. Nesilice su hranjene *ad libitum* smjesom koja je odgovarala dobi i pasmini nesilica u istraživanju. Pregledom farme utvrđena je značajna invadiranost objekta, što je uz prisutnost krvavih mrlja na ljuskama jaja i početak ljetnog razdoblja s visokim temperaturama, bila opravdana indikacija za početak terapije.

#### 3.2. ANTIPARAZITIK KORIŠTEN U ISTRAŽIVANJU

Kokoši nesilice u istraživanju terapiране su komercijalnim pripravkom s djelatnom tvari fluralaner (Exzolt, MSD) namijenjenim suzbijanju tekuti u peradi. Pripravak je korišten prema uputama proizvođača na način da je primijenjen putem pitke vode dvokratno u razmaku od sedam dana u dozi 0,5 mg/kg tjelesne mase kokoši. Terapija je započela u dobi 38 tjedana.

#### 3.3. UZORKOVANJE KRVI

Tijekom istraživanja uzeti su uzorci krvi punkcijom vratne vene (*v. jugularis*) u epruvete s antikoagulansom litijevim heparinom (BD Vacutainer™ Li-heparin 102 IU, Velika Britanija). Krv je uzorkovana neposredno prije terapije (0. dan) te 7., 14., 21. i 60. dana nakon početka terapije. Krvni razmazi u duplikatu napravljeni su neposredno nakon vađenja krvi iz krvne žile bez dodavanja antikoagulansa..

#### 3.4. ANALIZE

U uzorcima krvi određen je ukupan broj leukocita direktnom metodom po Nattu i Herricku brojanjem u Neubauerovom hemocitometru (NATT i HERRICK, 1952.).

##### 3.4.1. UTVRĐIVANJE UKUPNOG BROJA LEUKOCITA

Metoda brojenja krvnih stanica peradi po NATTU i HERRICKU (1952.) zasniva se na principu da se različite vrste krvnih stanica u krvi različito oboje s reagensom po Nattu i Herricku.

Otopina po Nattu i Hericku načini se na sljedeći način i čuva se u tamnoj boci:

NaCl	8,8 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,91 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
Formalin	7,5 mL
Gentiana violet B	0,25 g
Destilirana voda	do 1 L.

Krv se u eritrocitnom melanžeru razrijedi otopinom po NATTU i HERRICKU (1952.) u omjeru 1:200. Tako napunjen melanžer ostavi se stajati najmanje 15 minuta uz miješanje na mješalici kako bi se krvne stanice obojile. Hemocitometar se potom pravilno napuni te se broje leukociti.

Leukociti se broje na cijeloj površini mrežice, tj. na ukupnoj površini od 9 mm<sup>2</sup>, što znači u svih 9 polja. Broj leukocita u 1 litri krvi izračuna se na sljedeći način:

$$L \times 10^9 / L = \frac{N}{9} \times 10 \times 100 \times 10^6$$

#### 3.4.2. ODREĐIVANJE DIFERENCIJALNE KRVNE SLIKE

Krvni razmazi su obojeni metodom po Pappenheimu. Stanice su obojene s May-Grünwald i Giemsa bojama. Relativan broj heterofila, eozinofila, bazofila, monocita i limfocita utvrđen je brojenjem ukupno 100 leukocita. Utvrđen je omjer limfocita i heterofila.

Apsolutni broj pojedinih oblika leukocita izračunat je kao umnožak postotka pojedine populacije leukocita i ukupnog broja leukocita.

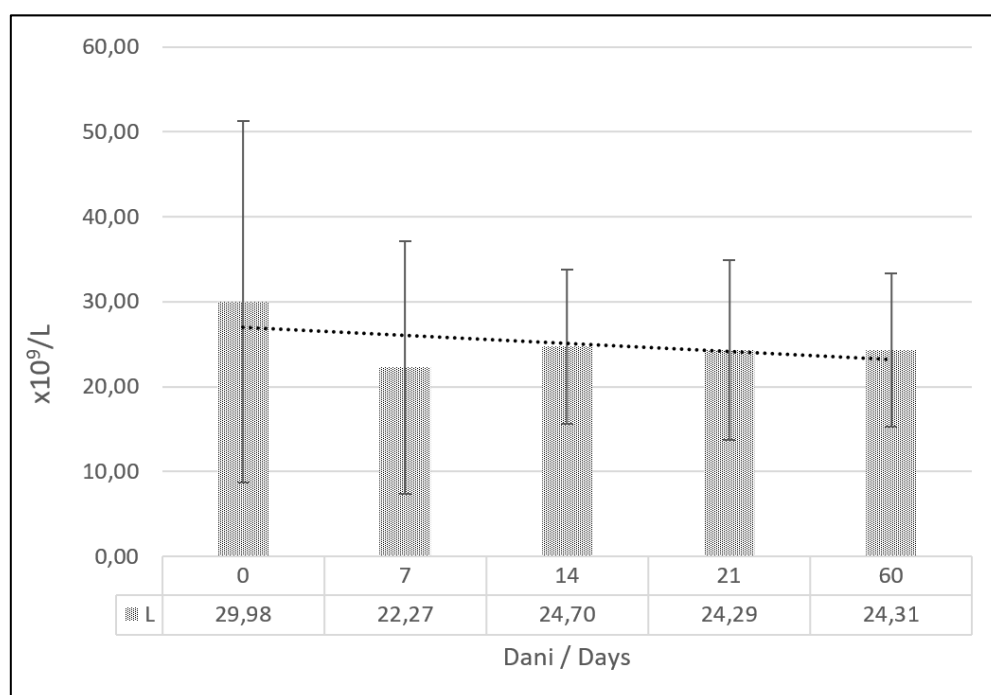
#### 3.5. STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati dobiveni analizama prvotno su testirani Kolmogorov-Smirnovljevim testom kako bi se utvrdila normalnost raspodjele podataka. Broj leukocita i koncentracija testiran je Kruskall-Wallisovom analizom varijance i sumom rangova, primjenom računalnog programa Statistica 13 (Tibco, SAD). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

## 4. REZULTATI

Rezultati praćenih hematoloških parametara ukupnog broja leukocita, te relativnog i apsolutnog broja pojedinih populacija i H/L omjera prikazani su na jednom grafu i u dvoje tablice.

Najveći ukupan broj leukocita zabilježen je prije terapijanja. Neposredno nakon terapije smanjuje se na najniže vrijednosti sedmog dana, da bi se potom ustalio na vrijednosti 24 x 10<sup>9</sup>/L do kraja praćenja (Slika 3.).



Slika 3. Ukupan broj leukocita (x10<sup>9</sup>/L) (srednja vrijednost±SD) po danima od početka terapije s naznačenom linijom trenda.

Tablica 1. Relativni broj pojedinih loza leukocita po danima u nesilica invadiranih tekućinama prije i nakon terapije fluralanerom (%) (srednja vrijednost±SD).

	N	Razdoblje uzorkovanja					P vrijednost
		0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	60. dan	
Limfociti	15	56,1±6,0	53,0±15,8	54,2±17,4	55,4±13,0	52,5±10,0	NS
Heterofili	15	40,2±5,5	42,4±14,8	38,2±9,2	41,8±12,2	44,5±10,7	NS
Eozinofili	14	3,1±1,4 <sup>a</sup>	3,1±1,2 <sup>a</sup>	2,9±0,6 <sup>ab</sup>	2,1±1,2 <sup>c</sup>	2,3±1,2 <sup>bc</sup>	<0,05
Bazofili	15	0,2±0,4	0,2±0,4	0,2±0,4	0,1±0,4	0,2±0,6	NS
Monociti	15	0,3±0,5 <sup>c</sup>	1,3±1,2 <sup>a</sup>	0,6±0,8 <sup>abc</sup>	0,6±0,9 <sup>abc</sup>	0,5±0,5 <sup>bc</sup>	<0,03

Statistički značajne razlike (p≤0.05) među terminima uzorkovanja označene su različitim malim slovima abecede (a,b,c), NS-nije značajno

Diferencijalna krvna slika ukazuje na veći relativan broj limfocita i manji broj heterofila prije početka terapije, no bez statistički značajnih razlika tijekom praćenja (Tablica 1.).

Udio eozinofila značajno je veći ( $p \leq 0,05$ ) u periodu prije i sedam dana nakon početka terapije dok se apsolutni broj eozinofila značajno smanjio 21. i 60. dana nakon terapije ( $p < 0,04$ ; Tablica 1. i 2.).

Tablica 2. Apsolutni broj pojedinih loza leukocita ( $\times 10^9/L$ ) po danima i H/L omjer u nesilica invadiranih tekutima prije i nakon terapije fluralanerom (srednja vrijednost $\pm$ SD).

	N	Razdoblje uzorkovanja					P vrijednost
		0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	60. dan	
Limfociti	15	15,9 $\pm$ 13,1	11,7 $\pm$ 7,6	13,6 $\pm$ 6,6	12,3 $\pm$ 8,0	13,1 $\pm$ 6,1	NS
Heterofili	15	12,2 $\pm$ 8,8	9,5 $\pm$ 8,4	9,1 $\pm$ 4,9	9,1 $\pm$ 5,8	10,4 $\pm$ 3,9	NS
Eozinofili	14	0,9 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,6 <sup>ab</sup>	0,7 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>	0,5 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	0,5 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	<0,04
Bazofili	15	0,05 $\pm$ 0,1	0,04 $\pm$ 0,1	0,05 $\pm$ 0,1	0,03 $\pm$ 0,09	0,02 $\pm$ 0,06	NS
Monociti	15	0,08 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,3 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	0,1 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>	0,04
H/L	15	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,0 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	0,9 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup>	0,9 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>	0,04

Statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) među terminima uzorkovanja označene su različitim malim slovima abecede (a,b,c), NS-nije značajno

Vrijednosti apsolutnog broja i relativnog udjela monocita se od početka istraživanja do sedmog dana značajno povećavaju ( $p < 0,04$ ) do  $0,3 \pm 0,4 \times 10^9/L$ , da bi se potom do 14. dana smanjile na  $0,1 \pm 0,2 \times 10^9/L$  i ostale na tim vrijednostima do kraja monitoringa.

Broj i udio bazofila nije se značajno mijenjao tijekom monitoringa.

Omjer heterofila i limfocita (H/L) kao pokazatelja reaktivnosti i stresa značajno se povećava od početka monitoringa do sedmog dana istraživanja, prateći broj monocita, da bi se potom spustio na 0,9 do kraja monitoringa (Tablica 2.).

## 5. RASPRAVA

Tekut peradi već je desetljećima ozbiljna prijetnja industriji jaja te zdravlju i dobrobiti životinja u uzgoju. U narednih nekoliko godina se očekuje porast populacije tekuti te porast akaricidne rezistencije što predstavlja vrlo veliki svjetski problem u peradarskoj industriji (AKBAYEV i sur., 2020.).

Tokom zadnjeg desetljeća su se, zbog nedostatka pripravaka, počeli koristiti različiti alternativni pripravci poput eteričnih ulja, praškastih silikatno-mineralnih pripravaka, dijatomejske zemlje i sličnoga. Ovi su pripravci davali dobre rezultate u alternativnim oblicima držanja peradi, pogotovo u manjim jatima koja se lakše kontroliraju, no u intenzivnim sustavima sa većim brojem jedinki i kompleksnijom opremom imaju ograničenu učinkovitost (QUILICOT i sur., 2020.). Stoga su se počeli pojačano istraživati i koristiti kemijski sintetizirane tvari koje dijeluju sistemski, poput pripravka baziranog na fluralaneru (GOTTSTEIN i sur., 2021.). Fluralaner se koristio per os ili kao spot on pripravak na kućnim ljubimcima u svrhu suzbijanja različitih ektoparazita (DRYDEN i sur., 2015.), no od nedavno se taj preparat počeo koristiti i na kokošima u cilju suzbijanja tekuti (THOMAS i sur. 2017.; PROHACZIK i sur., 2017.).

U ovom istraživanju korišteno je 2000 kokoši nesilica lake linije Lohmann Brown koje su terapirane preparatom na bazi fluralanera (Exzolt, MSD) te su praćeni hematološki parametri prije i 7., 14., 21. i 60. dan od početka terapije. Praćen je ukupni broj leukocita, relativni i apsolutni broj pojedinih loza leukocita te omjer heterofila i leukocita (H/L). Vrijednost ukupnog broja leukocita 0. dana je bila  $30 \times 10^9/L$ . Nakon primjene fluralanera vrijednost leukocita je do 7. dana pala na  $22 \times 10^9/L$  da bi se nakon 14 dana blago povisila i ostala na istoj razini do 60. dana od primjene. U istraživanju koje su sproveli TEMPLE i suradnici (2020.) također nisu zabilježene značajne promjene ukupnog broja leukocita tjedan dana prije primjene fluralanera, te tjedan dana i šest tjedana nakon primjene fluralanera. Visoka vrijednost na početku ukazuje na potencijalni ulazak infekta i na stanje iritacije i stresa te na nastajanje sistemskog uplanog odgovora u organizmu (GOTTSTEIN i sur., 2021.). Tokom prvog mjerenja ukupan broj limfocita i heterofila je bio viši te se nakon prve terapije fluralanerom smanjio što se može primjetiti već 7. dana. Ukupan broj limfocita se 14. dana blago povisio te je 21. dana ponovo pao i na kraju se 60. dana opet povisio na vrijednosti slične kao i 14. dana. Slične rezultate su dobili i PETERSEN i suradnici (2021.) u svojem istraživanju gdje je ukupan broj limfocita bio snižen 42. dana nakon aplikacije fluralanera.

U ovom istraživanju broj heterofila je nakon prve aplikacije blago pao te je zadržavao istu vrijednost do 60. dana kada je porastao, no nije prešao razinu prije tretiranja. Broj eozinofila je od 0. do 7. dana se značajno smanjio te se nastavio smanjivati do 21. dana nakon čega je zadržao konstantnu vrijednost. Povećan broj eozinofila ukazuje na parazitarne invazije i reaktivnost organizma, dok naglo smanjenje broja eozinofila ukazuje na vjerojatni oporavak od parazitarne invazije (GOTTSTEIN i sur., 2021.). Ukupan broj bazofila se nije značajno mijenjao tokom monitoringa. Za razliku od bazofila, vrijednosti monocita su se od 0. do 7. dana značajno povećale te su se njihove vrijednosti smanjile do 14. dana, no i dalje su bile veće nego 0. dana. Od 14. dana do kraja monitoringa te se vrijednosti nisu mijenjale. Monociti su krvne stanice iz kojih nastaju makrofazi koji su zaduženi za fagocitozu. Povećanje broja monocita kroz prvih sedam dana ukazuje na pojačanu antimikrobnu reaktivnost i stanje stresa u organizmu. Pad broja monocita u kasnijoj fazi terapije ukazuje na oporavak organizma i uklanjanje infekta iz organizma. Omjer H/L se od početka terapije do 7. dana znatno povećava te od 7. do 14. dana blago opada da bi se od 21. dana do kraja monitoringa zadržao na istoj vrijednosti. Promjene u omjeru H/L, isto kao i kod monocita, ukazuju na stanje stresa u organizmu i na potencijalnu aktivaciju infekta na početku terapije te na oporavak i uklanjanje infekta u kasnijoj fazi terapijanja (GOTTSTEIN i sur., 2022.). Rezultati istraživanja pokazuju da su svi hematološki parametri unutar fizioloških granica (SCANES, 2000.; WAKENELL, 2010.) što ukazuje da pripravak fluralaner nema nepovoljnih učinaka na terapijane jedinke kao što su dokazali i rezultati PROHACZIK i sur. (2017.) i THOMAS i sur. (2017.).

## 6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće:

1. Primjena fluralanera dovela je do smanjenja ukupnog broja leukocita no smanjenje nije bilo statistički značajno,
2. Primjena fluralanera dovela je do smanjenja apsolutnog broja limfocita i heterofila uz relativan porast heterofila do sedmog dana nakon terapije, što uz porast H/L omjera ukazuje na moguću povećanu reaktivnost i stres organizma,
3. Primjena fluralanera dovela je do koninuiranog značajanog smanjenja udjela i broja eozinofila do 21. dana što ukazuje na prestanak invazije i oporavak organizma,
4. Primjena fluralanera dovela je do značajanog porasta udjela i broja monocita 7. dana od početka terapije, a potom smanjenja i zadržavanje na nižim vrijednostima što ukazuje na moguću pojačanu reaktivnost i obranu organizma neposredno nakon početka terapije,
5. Dobivene vrijednosti pretraživanih parametara su u fiziološkim granicama te ukazuju da nema nepovoljnog učinka pripravka na tretiranu perad.



## 7. LITERATURA

1. BEUGNET, F., C. CHAUVE, M. GAUTHEY, L. BEERT (1997): Resistance of the red poultry mite to pyrethroids in France. *Vet. Rec.* 140, 577-579.
2. BRÄNNSTRÖM, S., D. A. MORRISON, J. G. MATTSSON, J. CHIRICO (2008): Genetic differences in internal transcribed spacer 1 between *Dermanyssus gallinae* from wild birds and domestic chickens. *Med. Vet. Entomol.* 22, 152-155.
3. BUDICIN, E. (2021): Hematološki parametri u kokoši nesilica nakon terapije tekuti pripravkom fluralaner. Studentski znanstveni rad za Rektorovu nagradu, Veterinarski fakultet, 1-18.
4. BUDICIN, E., L. LOZICA, D. HORVATEK TOMIĆ, G. KONTREC, I. SABOLEK, J. MILJKOVIĆ, M. OSTOVIĆ, A. SHEK-VUGROVEČKI, J. ALADROVIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2022): Changes of haematological parameters in layer hens after fluralaner treatment of mites. *Proceedings of "Poultry Days 2022"*, Poreč, 148-154.
5. CHIRICO, J., H. ERIKSSON, O. FOSSUM, D. JANSSON (2003): The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. *Med. and Vet. Entomol.* 17, 232-234.
6. DECRU, E., M. MUL, A. J. NISBET, A. H. VARGAS NAVARRO, G. CHIRON, J. WALTON, T. NORTON, L. ROY, N. SLEECKX (2020): Possibilities for IPM Strategies in European Laying Hen Farms for Improved Control of the Poultry Red Mite (*Dermanyssus gallinae*): Details and State of Affairs. *Front. Vet. Sci.* 7, 565866.
7. DI PALMA, A., A. GIANGASPERO, M. CAFIERO, G. S. GERMINARA (2012): A gallery of the key characters to ease identification of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Gamasida: Dermanyssidae) and allow differentiation from *Ornithonyssus sylviarum* (Acari: Gamasida: Macronyssidae). *Parasites & Vectors* 5, 104.

8. DRYDEN, M. W., V. SMITH, T. BENNET, L. MATH, J. KALLMAN, K. HEANEY, F. SUN (2015): Efficacy of fluralaner flavored chews (Bravecto®) administered to dogs against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis felis* and egg production. *Parasites & Vectors* 8, 364
9. GEORGE, D. R., R. D. FINN, K. M. GRAHAM, M. F. MUL, V. MAURER, C. VALIENTE MORO, O. A. E. SPARAGANO (2015): Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science? *Parasites & Vectors*, 8:178
10. GOTTSTEIN, Ž., L. LOZICA, I. SABOLEK, J. MILJKOVIĆ, M. OSTOVIĆ, J. ALADROVIĆ, A. SHEK-VUGROVEČKI, D. HORVATEK TOMIĆ (2021): Učinkovitost pripravka fluralanera u kontroli tekuti na farmama peradi. *Hrvatski veterinarski vjesnik* 29, 41-46.
11. KILPINEN, O. (2005): How to obtain a bloodmeal without being eaten by a host: the case of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Physiol. Entomol.* 30, 232-240.
12. KOWALSKI, A., R. SOKOL (2005): Influence of *Dermanyssus gallinae* (poultry red mite) invasion on the plasma levels of corticosterone, catecholamines and proteins in layer hens. *Pol. J. Vet. Sci.* 12, 231-5.
13. KRISTOFÍK, J., P. MASAN, Z. SUSTEK (1996): Ectoparasites of bee-eater (*Merops apiaster*) and arthropods in its nests. *Biologia* 51, 557-570.
14. MORO, C. V., C. CHAUVE, L. ZENNER (2005): Vectorial role of some Dermanyssoid mites (Acari, Mesostigmata, Dermanyssoidea). *Parasite* 12, 99-109.
15. MORO, C. V., C. J. DE LUNA, A. TOD, J. H. GUY, O. A. E. SPARAGANO, L. ZENNER (2009): The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Exp. Appl. Acarol.* 48, 93-104.
16. MUL, M., T. VAN NIEKERK, J. CHIRICO, V. MAURER, O. KILPINEN, O. A. E. SPARAGANO (2009): Control methods for *Dermanyssus gallinae* in systems for laying hens: results of an international seminar. *Worlds Poult. Sci. J.* 65, 589-600.

17. NATT, M. P., C. A. HERRICK (1952): A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult. Sci.* 31, 735-738.
18. QUILICOT, A. M. M., Ž. GOTTSTEIN, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, D. HORVATEK TOMIĆ (2020): Plant-derived products for the control of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778) - a review. *Worlds Poult. Sci. J.* 76, 549-561.
19. PETERSEN, I., K. JOHANNHÖRSTER, E. PAGOT, D. ESCRIBANO, E. ZSCHIESCHE, D. TEMPLE, E.
20. (2021): Assessment of fluralaner as a treatment in controlling *Dermanyssus gallinae* infestation on commercial layer farms and the potential for resulting benefits of improved bird welfare and productivity. *Parasites & Vectors* 14(1), 181.
21. PRITCHARD, J., T. KUSTER, O. SPARAGANO, F. TOMLEY (2015): Understanding the biology & control of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* : a review. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A.* 44, 1-42.
22. PROHACZIK, A., M. MENGE, B. HUYGHE, A. FLOCHLAY-SIGOGNAULT, G. LE TRAON (2017): Safety of fluralaner oral solution, a novel systemic antiparasitic treatment for chickens, in laying hens after oral administration via drinking water. *Parasites & Vectors* 10, 363.
23. SCANES, C. G. (2000): Blood. U: *Sturkie's Avian Physiology*. Ur.: C. G. Scanes, 167-191
24. SIGOGNAULT FLOCHLAY, A., E. THOMAS, O. A. E. SPARAGANO (2017): Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: a broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasites Vectors* 10, 357.
25. SPARAGANO, O. A. E., A. GIANGASPERO (2011): Parasitism in egg production systems: the role of the red mite (*Dermanyssus gallinae*). U: *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Egg Chemistry, Production and Consumption*. (Ur: Y. Nys, M. Bain, F. Van Immerseel), Woodhead Publishing Limited, 394-414.

26. THOMAS, E., M. CHIQUET, B. SANDER, E. ZSCHIESCHE, A. SIGOGNAULT FLOCHLAY (2017): Field efficacy and safety of fluralaner solution for administration in drinking water for the treatment of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestations in commercial flocks in Europe. *Parasites & Vectors* 10, 457.
27. WAAP, H., T. NUNES, M. F. MUL, J. GOMES, K. BARTLEY (2019): Survey on the prevalence of *Dermanyssus gallinae* in commercial laying farms in Portugal. *Avian pathology* 48.
28. WAKENELL, P. S. (2010): Hematology of Chickens and Turkeys. U: Schalm's veterinary hematology. Ur: Weiss, D. J., K. J. Wardrop, 6th ed, Blackwell Publishing Ltd., 958-967.

## 8. SAŽETAK

### Diferencijalna krvna slika kokoši lake pasmine nakon terapije tekuti pripravkom fluralaner

Gabriel Kontrec

Tekut peradi jedna je od najznačajnijih parazitarnih bolesti koja se javlja u intenzivnom uzgoju peradi. Postoji mnogo vrsta tekuti, no najučestalija je kokošja tekut (*Dermanyssus gallinae*). Ova tekut putem ugriza neposredno ugrožava životinjsko zdravlje uzrokujući stres, bol, kožne iritacije i pad proizvodnje, no može ugrožavati i posrednim putem kao prijenosnik bolesti. Za suzbijanje tekuti koristili su se različiti biološki akaricidni pripravci, no nisu se pokazali uspješnima stoga se počeo koristiti pripravak na bazi fluralanera (Exzolt, MSD). Fluralaner djeluje kao inhibitor živčanog sustava artropoda s antagonističkim djelovanjem na GABA receptore i receptore za glutamat i ujedno zaustavlja proizvodnju jajašaca kod ženki. Cilj ovog istraživanja bio je monitoring ukupnog broja leukocita, te relativnog i apsolutnog broja pojedinih loza i omjera heterofila i eozinofila (H/L) kod kokoši nesilica lake linije držanih slobodno u volijerama. Terapija peradi započela je s 38 tjedana starosti te je pripravak davan prema uputama proizvođača dva puta u razmaku od sedam dana u dozi od 0,5 mg fluralanera po kilogramu jedinke per os putem vode za piće. Krv je uzorkovana punkcijom vratne vene neposredno prije terapije (0. dan) te 7., 14., 21. i 60. dana nakon početka terapije. Dobiveni rezultati pokazuju da je došlo do smanjenja ukupnog broja leukocita, limfocita, heterofila i eozinofila, blagog porasta broja monocita te da se broj bazofila nije značajno mijenjao. Promjene u omjeru heterofila i leukocita ukazuju na potencijalnu aktivaciju infekta na početku terapije te na oporavak u kasnijoj fazi terapiranja. Terapija kokoši nesilica fluralanerom dovela je do oporavka jedinki i povratka hematoloških parametara unutar fizioloških granica te poboljšanja dobrobiti i proizvodnosti.

Ključne riječi: kokoši lake pasmine, tekut, fluralaner, diferencijalna krvna slika

## 9. SUMMARY

### Differential leukocyte count in light breed hens after treating poultry mites with fluralaner

Gabriel Kontrec

Poultry mites is one of the most important parasites in intensive poultry farming. There are many different types of mites, but the most common one is red poultry mite (*Dermanyssus gallinae*). This mites' bite indirectly puts animal health in danger by causing stress, pain, skin irritations and production decline, but it can also can also endanger the animals directly as a disease carrier. Many different acaricides have been used in order to suppress mite invasions, but they haven't been proven successful. Therefore a new drug, fluralaner (Exzolt, MSD) is being used. Fluralaner works as an inhibitor of the arthropodes' nerve system with an antagonistic action on GABA receptors and glutamate receptors and also stops egg production in females. The purpose of this study was to monitor the total number of leukocytes, the relative and absolute number of individual lineages and the heterophile and eozinophile (H/L ratio) in laying hens kept in free range aviary systems. The therapy began at 38 weeks of age and the drug was administered according to the manufacturer's instructions, twice, seven days apart in a dose of 0,5 mg fluralaner per 1 kilogram of bodyweight orally via drinking water. The blood was sampled by jugular venipuncture before the therapy (day 0.) and then 7., 14., 21. and 60. day after treatment. The results have shown a decrease in the number of leukocytes, lymphocytes, heterophiles and eozinophiles, the number of monocytes has slightly increased, while the number of basophiles hasn't significantly changed. The changes in the H/L ratio indicate on a potential germ activation on the beginning of therapy and in later stages of therapy on the recovery. The laying hens have fully recovered from the mite invasions and hematological parameters have been returned to their normal values.

Key words: hens of light breed, mites, fluralaner, differential blood count

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 15.11.1996. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Josipa Jurja Strossmayera u Zagrebu završio sam 2011. godine. Nakon toga upisao sam IX. gimnaziju te sam maturirao 2015. godine. Iste godine upisao sam integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pohađao sam osnovnu glazbenu školu od 2012. do 2016. godine. Tokom studija obavljao sam različite studentske poslove. Na znanstveno - stručnom simpoziju „Peradarski dani“ prezentiran je rad pod nazivom „Promjene u krvnoj slici kokoši nesilica lake pasmine nakon primjene fluralanera u terapiji tekuti“ čiji sam koautor. Također sam prisustvovao konferenciji „Eastern European Regional Veterinary Conference“ u Ljubljani 2022. godine. Jedan sam od suosnivača edukacijskog projekta o dobrobiti i ponašanju životinja pod nazivom „The Welfare Education Project“ u suradnji s OVMPH i HVK.