

UTVRĐIVANJE DIROFILARIOZE PASA PRIMENOM ELISA METODA I MODIFIKOVANOG KNOTT-OVOG TESTA

Sara Savić^{1*}, Živoslav Grgić¹, Biljana Vujkov², Ivan Fenjac³,
Dušan Pajković⁴ Marina Žekić¹,

¹ Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Rumenački put 20, Novi Sad

² Veterinarska ambulanta „Bilja i Olja”, Drage Spasić 2a, Novi Sad

³ Veterinarska ambulanta „Pedigre”, Krilova 3, Novi Sad

⁴ Vojska Srbije, Novi Sad

Kratak sadržaj

Dirofilarioza pasa je parazitsko oboljenje, čiji je uzročnik je *Dirofilaria immitis* ili *Dirofilaria repens*. Može se javiti kao kožni ili kao srčani oblik bolesti. Srčana forma oboljenja često se naziva i bolest „srčanog crva”, jer odrasli oblici jedne od dirofilarija parazitira u srcu. Tokom poslednjih pet godina više slučajeva dirofilarioze prijavljeno je na nekoliko regiona Srbije (Dimitrijević, 1999; Savić-Jevđenić i sar., 2004). Na početku su dirofilarije bile otkrivane samo kao usputni nalaz tokom obdukcije, a u poslednje dve godine sve više je zahteva za dokazivanje dirofilarioze kod živih pasa. Kliničku sliku kod pasa obolelih od dirofilarioze čine povremeni kašalj, apatija, poremećaj disanja, poremećaj srčanog rada, mršavljenje i brzo zamaranje psa. Pojava simptoma zavisi od jačine infekcije, a izraženost kliničke slike zavisi od aktivnosti psa. Dijagnostika dirofilarioze se može vršiti pregledom iz krvi pomoću modifikovanog Knott-ovog testa ili nekom od seroloških metoda. Materijal za rad je predstavljala krv 45 pasa koji potiču iz regiona gde je tokom prethodnih godina utvrđeno prisustvo dirofilarija kod pasa, uglavnom prilikom obdukcije, kao i od pasa koji su imali kliničke simptome i bili upućeni na analizu od strane veterinara ili samih vlasnika. Metode korišćene za analiziranje krvi pasa su modifikovani Knott-ov test za dokazivanje mikrofilarije u punoj krvi i ELISA test. Od 35 ispitivanih pasa bez kliničkih simptoma, kod 4 psa je utvrđeno prisustvo antigena *Dirofilaria immitis* u krvnom serumu, što čini 11% ispitivanih pasa. Ispitivanjem 10 pasa sa kliničkim simptomima kašljanja, otežanog disanja, apatije i brzog zamaranja, kod 8 pasa je utvrđeno prisustvo mikrofilarija u cirkulaciji (ELISA test) i dokazano prisustvo antigena *D. immitis*. Kod dva psa, terapija je bila uspešna.

Ključne reči: dirofilarioza pasa, dijagnostika, terapija

* E-mail: sara@niv.ns.ac.rs

DETERMINATION OF CANINE DIROFILARIASIS BY ELISA METHOD AND MODIFIED KNOTT'S TEST

Sara Savić^{1**}, Živoslav Grgić¹, Biljana Vujkov², Ivan Fenjac³,
Dušan Pajković⁴ Marina Žekić¹

¹ Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Rumenački put 20, Novi Sad

² Veterinary ambulance "Bilja i Olja", Drage Spasić 2a, Novi Sad

³ Veterinarska ambulance "Pedigre", Krilova 3, Novi Sad

⁴ The Army of Serbia, Novi Sad

Abstract

Canine dirofilariasis is a parasitic disease. The causative agent is *Dirofilaria immitis* or *Dirofilaria repens*. It may appear as skin or as a heart disease. The heart form of the disease is often named "heartworm" disease, because the adult parasites live in the heart. In the last five years, several cases of dirofilariasis have been reported (Dimitrijević, 1999; Savić-Jevđenić et al., 2004). At the beginning dirofilariasis was discovered only as a by-the-way finding during autopsy, but last two years there were more requests for examination of dirofilariasis in alive dogs. Clinical symptoms in dogs with dirofilariasis are occasional coughing, apathy, breathing difficulties, heart failure, progressive loss of weight and rapid fatigue. The variety of symptoms depends on the intensity of infection, and the symptoms depend on the activity of a dog. For the diagnostics of dirofilariasis, the modified Knott's test or another serology methods may be used. In our research we used 45 blood samples, taken from the dogs in the region where dirofilariasis was detected mostly through autopsy, but also from the dogs with clinical symptoms in which cases the owners or veterinarians had sent the samples for analysis. The modified Knott's test was used for proving microfilaria in full blood and ELISA test was applied for detection of *D. immitis* antigen. Out of 35 examined dogs with no clinical symptoms, in 4 dogs the presence of antigene *Dirofilaria immitis* was detected in blood sera, which is 11% of the examined dogs. The examination of 10 dogs with clinical symptoms (coughing, difficult breathing, apathy and rapid fatigue) showed the presence of microfilaria in circulation (ELISA test) and the presence of antigen *D. immitis* in 8 dogs. Therapy was successful in two cases.

Key words: canine dirofilariasis, diagnostics, therapy

** E-mail: sara@niv.ns.ac.rs

UVOD

Dirofilarioza pasa je parazitsko oboljenje, a uzročnik je *Dirofilaria immitis* ili *Dirofilaria repens*. Može se javiti kao kožni ili kao srčani oblik bolesti. Srčana forma oboljenja se često naziva i bolest „srčanog crva”, jer odrasli oblici jedne od dirofilarija parazitira u srcu. Za postojanje i širenje ovog oboljenja je neophodno prisustvo komaraca, jer bez njih ne može da se odvije kompletan životni ciklus dirofilarija. Simptomi dirofilarioze su nespecifični – kašalj, gubitak apetita, gubitak glasa, mršavljenje, umor, krvarenje iz nosa, otežan rad srca, hematurija i sl. kod srčane forme oboljenja, dok su kod kožne forme promene na koži u vidu ranica, čvorića, gubitka dlake na oštećenim mestima i pojava svraba.

Kao posledica klimatskih promena tokom poslednjih decenija, kao i sve slobodnijeg transporta pasa i mačaka po Evropi, nastala je pojava dirofilarioze, zajedno sa drugim vektor prenosivim bolestima, na sve većem geografskom području. Stalnim porastom srednje godišnje temperature, predviđa se da su letnje temperature dovoljne da se obezbedi inkubacija dirofilarija u komarcima, čak i na većim nadmorskim visinama, odnosno da će se dirofilarioza pojavljivati i u područjima gde je ranije nije bilo (Genchi i sar., 2009).

Tokom poslednjih pet godina više slučajeva dirofilarioze je prijavljeno na teritoriji Srbije. Na početku su dirofilarije bile otkrivane samo kao usputni nalaz tokom obdukcije, a u poslednje dve godine sve više je zahteva za dokazivanje dirofilarioze kod živih pasa. Prva informacija o postojanju dirofilarioze na prostorima Srbije je objavljena 1999. godine (Dimitrijević, 1999). Od tada, svake godine je sve više prijavljenih slučajeva pasa sa dirofilariozom. Takođe, na području Vojvodine prijavljeni su prvi slučajevi dirofilarioze 2003. godine (Tasić i sar., 2003). Nakon toga, rađeno je više ispitivanja u različitim delovima Vojvodine, mnogo češće kod živih pasa, tako da su veterinari i vlasnici pasa postali svesni prisustva ove bolesti na našem području.

Kliničku sliku nije moguće primetiti kod svih inficiranih pasa. Ima slučajeva kada su psi potpuno bez simptoma. Uglavnom, kliničku sliku kod pasa obolelih od dirofilarioze čine povremeni kašalj, apatija, tahipneja, dispneja, mršavljenje i brzo zamaranje psa. Klinička slika zavisi od jačine infekcije, a izraženost kliničke slike zavisi od aktivnosti psa. Klinički simptomi se lakše primeće i izražajni su kod radnih pasa i lovnih pasa tokom vršenja aktivnosti, nego kod kućnih pasa, pogotovo onih koji su inače slabo aktivni.

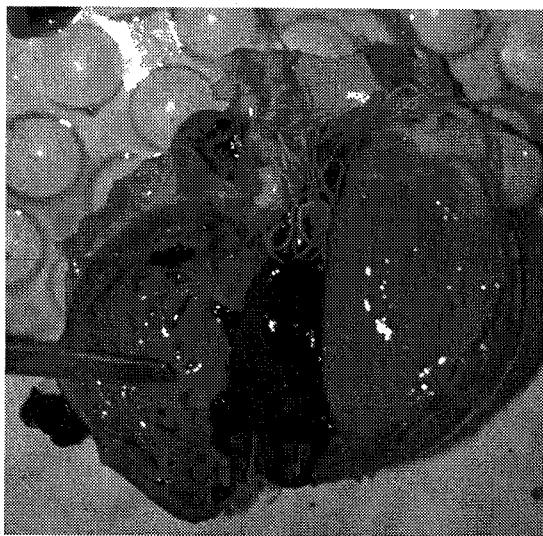
Dijagnostika dirofilarioze se može vršiti dokazivanjem uzročnika u krvi primenom modifikovanog Knott-ovog testa ili dokazivanjem antigena. Pregledom krvi Knott-ovim testom se otkrivaju mikrofilarije u cirkulaciji, dok se ELISA testom otkrivaju specifična antitela protiv dirofilarija u krvnom serumu i kada razvojnih oblika više nema u cirkulaciji.

Terapija dirofilarioze nije jednostavna, jer primena lekova nosi određeni rizik za psa, zbog načina aplikacije i eventualnih propratnih dejstava leka, koja mogu dovesti do komplikacija koje ugrožavaju život psa. Preparati za terapiju dirofilarioze su skupi i nisu svi dostupni na domaćem tržištu lekova. Kod pasa koji imaju kliničke simpto-

me vezane za respiratorni trakt (pneumonitis) treba najpre davati antiinflamatorne doze kortikosteroida, pre terapije protiv odraslih oblika parazita. Pacijentima se određuje strogo mirovanje, najbolje u kavezu, u vremenu od 4 do 6 nedelja, nakon terapije protiv odraslih oblika parazita (adulticidna terapija). Kod blagih infekcija, prognoza može biti dobra, dok kod težih slučajeva oboljenja sa teškom pulmonarnom tromboembolijom ili kongestivnom manom srca, prognoze su nepovoljne i nepredvidive. Prevencija dirofilarioze je moguća upotrebom preparata kao što je melarsomin (Melarsomine), koji se aplikuje u dve doze. Ovaj preparat je adulticid i prema literaturnim podacima efikasnost je i do 96% (Hoch i Strickland, 2008).

MATERIJAL I METODE

Materijal: Kao materijal koristili smo uzorke krvi 45 pasa koji potiču iz regiona gde je prethodnih godina utvrđeno prisustvo dirofilarija kod pasa, nakon obdukcije, kao i od pasa koji su imali kliničke simptome dirofilarioze i bili upućeni na analizu od strane veterinara ili samih vlasnika.



Slika 1 – Prisustvo odraslih oblika dirofilarija u srcu psa.

Tokom perioda 2006. i 2007. godine, analizirano je 45 pasa sa teritorije Novog Sada i okoline. Od toga 35 pasa su bili bez kliničkih simptoma i poticali su sa područja u kojima je ranije utvrđeno prisustvo dirofilarioze pasa. Ostalih 10 pasa su imali kliničke simptome u vidu otežanog disanja, kašljanja i lakog zamaranja pri radu i svi su aktivno učestvovali u lovu.

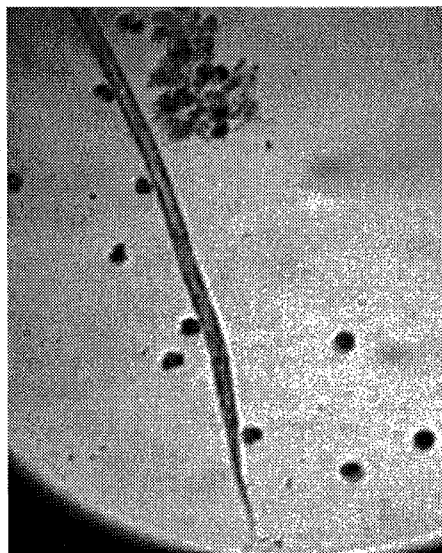
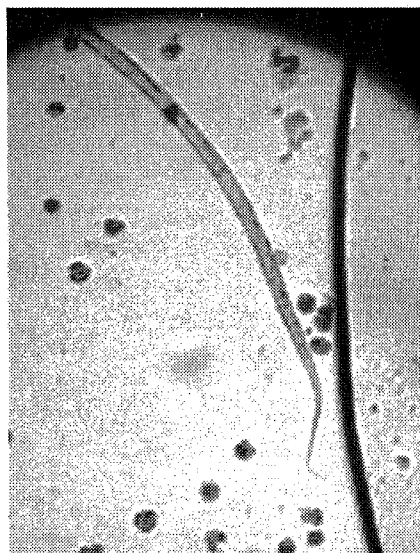
Metod: Analiza krvi pasa je rađena pomoću dva metoda i to su modifikovani Knott-ov test za dokazivanje mikrofilarije u punoj krvi i ELISA test (Canine Heartworm Antigen test kit, IDEXX Laboratories) za detekciju antigena *Dirofilaria immitis* u serumu ili plazmi pasa.

REZULTATI I DISKUSIJA

Ispitivanjem 35 pasa bez kliničkih simptoma prisustvo antigena *Dirofilaria immitis* u krvnom serumu utvrđeno je kod 4 životinje, odnosno 11% pasa. Kod 10 pasa sa kliničkim simptomima kašlja, otežanog disanja, apatije i brzog zamaranja, kod 8 je utvrđeno prisustvo mikrofilarija u cirkulaciji, odnosno nalaz Knott-ovim testom je bio pozitivan. Primenom ELISA testa, takođe je kod istih 8 pasa sa kliničkim simptomima utvrđen antigen *D. immitis*. Kod dva psa sa kliničkim simptomima primenom oba metoda dobijen je negativan nalaz.

Kod 2 pasa, od ukupno 8, kod kojih je utvrđeno prisustvo *D. immitis* je sprovedena terapija. Prvo je primenjena makrofilaricidna (adulticidna), a zatim mikrofilaricidna terapija. Lečenje je vršeno tokom dve etape – uništavanje odraslih odlika i uništavanje mikrofilarija. Kao adulticid korišćen je melarsomin dihidrohlorid 2,2 mg/kg, koji je davan dva puta u razmaku od mesec dana. Aplikacija preparata je vršena duboko u leđnu muskulaturu pod pravim uglom i takva način nosi određeni rizik za pojavu otoka, bola, apscesa, crvenilo, šok. U slučaju ovakvih propratnih pojava treba dati daksametazon odmah nakon davanja terapije. Pas mora apsolutno da miruje 4-6 nedelja nakon terapije, zbog mogućnosti da se odrasli oblici dirofilarija otpuste sa srčanog zida i izazovu pojavu embolije, pa se preporučuje boravak psa u kavezu. Terapija protiv mikrofilarija sastojala se od mesečne doze milbemicin oksima u dozi 0,5 mg/kg.

Kontrolni pregled krvi pasa na prisustvo mikrofilarija, vršen je pet meseci nakon primene terapije i tada nije utvrđeno prisustvo larvi u cirkulaciji Knott-ovim testom. Međutim, primenom ELISA testa u uzorcima krvnog seruma pasa 5 meseci nakon



Slika 1 – Mikroskopski izgled *Dirofilaria immitis*,
modifikovanom metodom po Knott-u.

terapije dobijen je pozitivan nalaz na prisustvo antigena *D. immitis*, odnosno dokazano je prisustvo antigena *D. immitis* u krvi ispitivanih pasa.

Za dijagnostiku dirofilarioze u slučaju postojanja mikrofilarioze, modifikovan Knott-ov test se pokazao kao pouzdana i precizna metoda u ovom istraživanju. Kod prisustva odraslih oblika u srcu, a u slučaju nemogućnosti detekcije mikrofilarija u cirkulaciji, ELISA test je dijagnostički metod izbora, što je u skladu sa nalazima drugih autora (Baneth, 2006).

Kada se radi o terapiji dirofilarioze, autori navode da je moguća samo mikrofilaricidna terapija, ili adulticidna i mikrofilaricidna terapija, u zavisnosti od korištenih preparata. U terapiji dirofilarioze se mogu koristiti preparati ivermektina, mikso-dektina, milbemicina (Baneth i sar., 2006). Bazzocchi i saradnici, kao i Atkins su radili terapiju dirofilarioze ivermektinom u kombinaciji sa doksiciklinom i dobili zadovoljavajuće rezultate. Prema njihovom istraživanju, efekat kombinacije ova dva leka (ivermektin 6µg/kg p/o kao nedeljna doza i doksiciklin 10mg/kg na dan, p/o više nedelja) je bio opadanje broja mikrofilarija u cirkulaciji, kao i adulticidni efekat. Ukupan efekat kombinacije leka je bio mnogo veći od efekta pojedinačnog davanja jednog i drugog preparata. Aplikacija ovih preparata je jednostavna, međutim davanje antibiotske terapije traje više meseci (Atkins, 2006; Bazzocchi i sar., 2008). Terapija melarsomin dihidrohloridom u kombinaciji sa milbemicin oksimom se pokazala kao efikasna u praksi i u ovom istraživanju, uz opreznost prilikom aplikacije preparata.

ZAKLJUČAK

Ispitivanjem 35 pasa bez kliničkih simptoma, prisustvo antigena *Dirofilaria immitis* u krvnom serumu utvrđeno je kod 4 životinje, odnosno 11% pasa. Kod 10 pasa sa kliničkim simptomima kašlja, otežanog disanja, apatije i brzog zamaranja, kod 8 je utvrđeno prisustvo mikrofilarija u cirkulaciji, odnosno nalaz Knott-ovim testom je bio pozitivan. Primenom ELISA testa, takođe je kod istih 8 pasa sa kliničkim simptomima utvrđen antigen *D. immitis*.

Knott-ov test i ELISA test su zadovoljavajući dijagnostički metod za postavljanje objektivne dijagnoze kod dirofilarioze pasa. Ukoliko su prisutne mikrofilarije u cirkulaciji, Knott-ovim testom se one nesumnjivo potvrđuju. Ako postoje samo odrasli oblici dirofilarija u srcu, prisustvo antigena se utvrđuje ELISA testom.

Terapija kod dirofilarioze nije jednostavna, od postupka primene lekova, kada je neophodna velika preciznost, do pojave neželjenih reakcija kod pasa. Terapija je efikasna i kod su kod pasa prisutni i odrasli i larveni oblika *D. immitis* i kompletna je ako ispoljava dejstvo protiv oba oblika parazita. Uklanjanjem samo mikrofilarija iz cirkulacije smanjuje se mogućnost širenja dirofilarioze. Nakon terapije, pse treba posmatrati još neko vreme (više meseci) radi provere efekata terapije.

Kod pasa koji imaju kliničke simptome u vidu otežanog disanja, prekomernog zamaranja i kašlja, veterinari u praksi počeli su da obraćaju pažnju na mogućnost

pojave dirofilarioze i ovo oboljenje više nije nepoznanica ni veterinarima ni vlasnicima pasa.

Dijagnostička ispitivanja na dirofilariozu su potrebna, pre svega, kod pasa sa kliničkim indikacijama i na prostorima gde postoje uslovi za širenje infekcije. Terapija je potrebna kod svakog dijagnostikovanog slučaja oboljenja i uspešno se primenjuje i u drugim zemljama i kod nas.

LITERATURA

1. Atkins C., Paul M.: Heartbreakers: Dodging the difficulties of *Dirofilaria immitis*. In: Proceedings of the North American Veterinary conference, Volume 20, Florida, small animal edition, 1017-1019, 2006.
2. Baneth G.: Two causes of canine and feline dirofilariasis. In: Proceedings of 2006 World Congress WSAVA/FECAVA, 481, 2006.
3. Bazzocchi C., Mortarino M., Grandi G., Kramer L.H., Genchi C., Bandi C., Genchi M., Sacchi L., McCall J.W.: Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs, *International Journal for Parasitology* 38, 1401-1410, 2008.
4. Dimitrijević S.: Dirofilarioza ante portas. U: Zbornik radova prvog savetovanja Clinica Veterinaris, 58, 1999.
5. Savić-Jevđenić S., Vidić B., Grgić Ž., Milovanović A.: Brza dijagnostika dirofilarioze pasa u regionu Novog Sada, *Veterinarski glasnik* 58, 5-6, 693-698, 2004.
6. Tasić A., Katić-Radivojević S., Klun I., Mišić Z., Ilić T., Dimitrijević S.: Prevalencija filarioza pasa u nekim delovima Vojvodine. U: Zbornik i kratki sadržaji, 15. Savetovanje veterinara Srbije, 172, 2003.
7. Hoch H., Strickland K.: Canine and feline dirofilariasis: prophylaxis, treatment and complications of treatment, *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarians*, 30, 3, 146-51, 2008.
8. Genchi C., Rinaldi L., Mortarino M., Genchi M., Cringoli G.: Climate and dirofilaria infection in Europe, *Veterinary Parasitology* 163, 4, 286-92, 2009.

Primljeno: 02.11.2009.

Odobreno: 23.11.2009.