

SEROLOŠKI MONITORING LIŠMANIOZE PASA U HRVATSKOJ: OPCIJA ILI NUŽNOST?

Tatjana Živičnjak, Franjo Martinković, Damir Lukačević, Vladimir Mrljak, Branko Goljak, Viktorija Kutičić, Zoja Bačetić

KLJUČNE RIJEČI: pas, lišmanioza, monitoring, *L. infantum*, Hrvatska, IF

UVOD

Prvi zapisi u lišmaniozi pasa u našim krajevima datiraju s početka 20-og stoljeća, (TARTAGLIA, 1937). Prije desetak je godina je kod nas prvi puta iz bolesnog psa izoliran parazit iz roda *Leishmania* (ŽIVIČNJAK i sur. 1998), a nedavno je potvrđeno da se radi o vrsti *Leishmania infantum* (ŽIVIČNJAK i sur., 2005) za koju je pas rezervoar koji može ali i ne mora pokazivati kliničke znakove bolesti (SLAPPENDEL and GREENE, 1990). Kod psa je bolest multisistemska; kad se manifestira klinički, dominiraju generalizirana limfadenopatija, i/ili promjene na koži, zglobovima, noktima, očima, bubrezima, koagulopatije itd. (FERRER i sur., 1988; CIARAMELLA i sur., 1997; KOUTINAS i sur., 1999). Liječenje nije jednostavno niti jeftino, a u nekim zemljama naredene mjere eutanazije nisu doprinijele poboljšanju epizootiološke situacije jer su bolesni psi ubrzo zamijenjeni novim, primljivim psima (COURTENAY i sur., 2002). Mogućnosti stvaranja i održavanja žarišta *L. infantum*, osim o postojanju invadiranih pasa, ovisi i o prisutnosti posrednika, hematofagnog insekta iz porodice Phlebotominae, rod *Phlebotomus* („papatači“), podrod *Larrousius*. Ženka papatača prenosi uzročnika na drugog psa ili čovjeka nekoliko dana nakon hranjenja na invadiranom psu (KILLICK-KENDRICK, R., 1999). Primjenom insekticida-repelenta je donekle moguće zaštititi pse od uboda i invazije (FOGLIA MANZILLO i sur., 2006). Entomološka istraživanja koja su provedena na području srednje i južne Dalmacije su potvrdila da je tamo posrednik prisutan (MIŠČEVIĆ i sur., 1998; BOSNIĆ i sur., 2006). Jedno entomološko istraživanje koje je provedeno u neenzootskom području priobalja (otok Krk) također je pokazalo da su i tamo prisutni posrednici, iako nema zabilježenih slučajeva lišmanioze kod pasa (ŽIVIČNJAK i IVOVIĆ, neobjavljeni podaci). U srednjoj i južnoj Dalmaciji seroprevalencija među psima varira od 0-40% ovisno o lokaciji (ŽIVIČNJAK i sur. 2005;), ali i o poduzetim mjerama (ŽIVIČNJAK i sur. 2007). Odlukom Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva je u razdoblju od 2002-2005. na snazi bila *Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju* prema kojoj na području Dubrovačko-neretvanske, Šibensko-Živičnjak i sur., SEROLOŠKI MONITORING LIŠMANIOZE PASA U HRVATSKOJ

kninske i Splitsko-dalmatinske županije morali biti pretraženi lovački psi, radni psi, psi koji borave na otvorenom i lešine ustrijeljenih ili uginulih čagljeva. U 2006. godini je Naredba ukinuta iako su rezultati serološkog monitoringa u enzootskom području tijekom 2005. godine pokazali da je 7,9 % pasa (141/1776), bilo serološki pozitivno (ŽIVIČNJAK i sur. 2007). Zabrinjavajuća je činjenica da je u Zagrebu samo tijekom prvih 9 mjeseci 2008. godine lišmanioza dijagnosticirana kod 6 pasa koji su prethodnih godina boravili tijekom ljetnih mjeseci na području srednje ili južne Dalmacije, a u čitavoj prethodnoj (2007) godini kod tri psa, od kojih su dva bila invadirana izvan granica RH.

MATERIJAL I METODE

Životinje

U radu su opisani rezultati serološke pretrage na lišmaniozu kod 362 psa starija od 6 mjeseci, raznih pasmina i kategorija, pretraženih prvih 9 mjeseci 2008. godine (podaci iz laboratorijskog i ambulantnog protokola Zavoda za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu). Od toga je 47 uzoraka od pasa iz enzootskog područja (Splitsko-dalmatinska, Dubrovačko-neretvanska, Šibensko-kninska županija) gdje je lokalni veterinar zbog sumnje na lišmaniozu tražio serološku pretragu (skupina A); 156 uzoraka uzetih od asimptomatskih pasa (monitoring) u enzootskom području (skupina B), 38 uzoraka od pasa koji žive u daleko od enzootskog područja, ali boravili su kraće ili dulje vrijeme u enzootskom području, a klinički su bili sumnjivi na lišmaniozu, (skupina C), kod 51 asimptomatskog psa iz Zadra (skupina D); koji je u županiji koja graniči s enzootskim područjem, te kod 70 asimptomatskih pasa iz ne-enzootskog područja hrvatskog priobalja, odnosno s otoka Krka (skupina E).

Uzorci

Nakon obuzdavanja psa u stojećem, sjedećem ili ležećem položaju, izvađeno je oko 5 ml krvi iz desne cefalične vene (*v. cephalica antebrachii dex.*), iglom promjera 1,1 mm i duljine 40 mm, u staklenu epruvetu bez antikoagulansa s čepom. Krv je držana na 4 °C 2-4 sata, nakon čega je oko 1 ml seruma prebačen u plastične tuljčiće, obilježen, te smrznut na -20°C, gdje je čuvan do izvođenja serološke pretrage.

Serološka pretraga

Antigen za indirektnu imunofluorescenciju je proizveden i pripremljen po prethodno opisanom protokolu (ŽIVIČNJAK i sur., 2005, MARTINKOVIĆ i MARINCULIĆ 2006).

Provedeno je testiranje u serijskim razrjeđenjima počevši od 1/40 (cutt-of) , a seropozitivnim je smatran uzorak koji jasno fluorescira u razrjeđenju 1/80 ili višem.

Referentni pozitivni serum je potjecao od psa iz enzootskog područja (Makarska), bolesnog od lišmanioze, kod kojeg je serološki i parazitološki dokazana *Leishmania infantum*, zimodema MON-1 .Referentni negativni serum je potjecao od klinički zdravog, serološki negativnog psa iz enzootskog područja (Zadvarje).

REZULTATI

Skupni prikaz rezultata nalazi se u Tablici 1.

Među klinički sumnjivim psima iz enzootskog područja (skupina A) je bilo 40,4 % seropozitivnih, odnosno 19 seropozitivnih od ukupno 47 pasa. Monitoringom među asimptomatskim psima u enzootskom području (skupina B) je detektirano 22 seropozitivna (14,2 %) od ukupno 156 pasa. U neenzootskom području je od 38 klinički sumnjivih pasa 11 (28,9 %) bilo serološki pozitivno (skupina C). U Zadru koji je u županiji koja graniči s enzootskom regijom (skupina D) i na otoku Krku (skupina E) koji je daleko od enzootskog područja monitoringom nisu detektirani pozitivni psi.

oznaka skupine	ukupno pretraženo (N)	pozitivni/negativni (N)	% pozitivnih
A	47	19/28	40,4
B	156	22/134	14,2
C	38	11/27	28,9
D	51	0/51	0,0
E	70	0/70	0,0
UKUPNO (N)	362	52/310	14,3

Tablica 1. Rezultati serološke pretrage po skupinama

RASPRAVA:

Rezultati serološke pretrage klinički sumnjivih pasa (skupine A i C) pokazuju da su veterinari u enzootskoj regiji, ali i izvan nje, dobro upoznati s kliničkom slikom lišmanioze kod pasa.

Rezultati monitoringa među asimptomatskim psima (skupina B) su pokazatelj prave

epizootiološke situacije u enzooskoj regiji i 14,2 % pretraženih pasa je serološki pozitivno. U vrijeme donošenja Naredbe, 2002. godine 15,0 % pasa je bilo seropozitivno, a na kraju 2005. godine 7,9 %. Može se zaključiti da su naredene mjere ipak polučile rezultat, a samo dvije godine po prestanku provođenja mjera, udio asimptomatskih, seropozitivnih pasa je u porastu. Iako monitoringom u Zadarskoj županiji nije detektiran pozitivan pas (skupina D), zbog relativno malog uzorka nije isključeno da je počelo formiranja žarišta, jer je u Zadarskoj županiji prijašnjih godina bilo pozitivnih pasa koji su dovedeni iz enzooskog područja. Iako još nisu provedena entomološka istraživanja, vrlo je vjerojatno da je insekt-posrednik prisutan. Činjenica da monitoringom na otoku Krku nije bilo pozitivnih pasa (skupina E), zbog prisutnosti posrednika će se cijeli ciklus pokrenuti kad na otok dođu pozitivni psi. Naime, tamo dolazi veliki broj lovaca sa svojim psima, posebno iz dijelova Italije gdje je lišmanioza enzooska.

Vlasnici lovačkih pasa i uzgajivači nisu u stanju financirati troškove serološkog monitoringa u cijelom uzgoju, odnosno detekciju asimptomatskih pozitivnih pasa. Oni obično zahtijevaju serološku pretragu klinički sumnjivog psa; ako je seropozitivan zaliječe ga i prodaju, a nitko više nije odgovoran za praćenje postupka s bolesnom životinjom. To znači da se takvi psi i uvoze, posuđuju, namjerno i nenamjerno stavljaju u uzgoj, te što je najgore, prodaju. Na terenu se veterinari snalaze na različite načine i nabavljaju brze testove za dijagnostiku lišmanioze pasa. Takvim testovima se ne može odrediti titar protutijela, a nisu niti dovoljno osjetljivi za detekciju nižeg titra kod seropozitivnih asimptomatskih pasa.

ZAKLJUČCI

Lišmanioza je enzooski prisutna u srednjoj i južnoj Dalmaciji. Zbog velike mobilnosti ljudi i pasa, postepeno se uvode pozitivni psi u područja gdje nema žarišta, gdje je nastajanje novih žarišta direktno ovisno o postojanju posrednika. Posrednik se također može širiti prema područjima gdje ga nije prije bilo. Iako nije moguće u potpunosti suzbiti lišmaniozu, nužno je redovito provoditi serološki monitoring svih pasa u enzooskom području, ali važno je i entomološkim istraživanjima pratiti difuziju vektora. Jednako bi bilo važno da kinološke i lovačke udruge potiču svoje članove da prije prodaje ili kupovine novog psa nakon relevantnog i pouzdanog serološkog testiranja dobiju potvrdu o seronegativnosti. Nema smisla uvoditi eutanaziju kao obaveznu mjeru suzbijanja, ali ako vlasnik odluči liječiti psa, netko mora nadzirati tijek liječenja, provoditi kontrole titra i onemogućiti preprodaju. Također je nužno poticati mjere dezinfekcije potencijalnih staništa posrednika i primjenu

repelenta na svim psima. Najveći problem u provođenju monitoringa i općenito suzbijanju lišmanioze je cijena pretrage, ali i neinformiranost nekih veterinarara.

Monitoring asimptomatskih pasa je financiralo Ministarstvo znanosti obrazovanja i sporta (projekt No: 053-0532266-2224 „Raširenost lišmanioze pasa i papatača posrednika u hrvatskom priobalju” u okviru programa „Protozojske bolesti-od epizootologije do terapije”)

LITERATURA:

- BOSNIĆ, S. L. GRADONI, L., C. KHOURY, M. MAROLI (2006): A review of leishmaniasis in Dalmatia (Croatia) and results from recent surveys on phlebotomine sandflies in three southern counties. *Acta Trop.* 99(1):42-9.
- COURTENAY, O., R.J. QUINNELL, L.M. GARCEZ, J.J. SHAW, C. DYE (2002): Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.* 186:1314–20.
- FOGLIA MANZILLO, V., G. OLIVA, A. PAGANO, L. MANNA, M. MAROLI, L. GRADONI (2006): Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet. Parasitol.* 142: 142–45.
- KILLICK-KENDRICK, R. (1999): The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clin. Dermatol.* 17:279–89.
- MARTINKOVIĆ, F., A. MARINCULIĆ (2006): Antibodies against *Leishmania* cross-react with *Crithidia luciliae*: indirect immunofluorescence and Dot-ELISA study in dogs. *Parasitol. Res.* 98: 378–80.
- MIŠČEVIĆ, Z., M. MILUTINOVIĆ, V. IVOVIĆ (1998). Fauna and distribution of sandflies (*Diptera, Phlebotomidae*) in Yugoslavia, Croatia, Macedonia and their role in the transmission of parasitic and viral diseases. *Acta Veterinaria* 48:163-72.
- SLAPPENDEL, R.J., C.E GREENE (1990): Leishmaniasis. U: Mills, L.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Saunders, Philadelphia, PA, pp. 769-77.
- TARTAGLIA, P. (1937): La leishmaniose canine a Split, *Bull. Office Intern. Hyg. Publ.* XXIV 9

ŽIVIČNJAK, T., D. STOJČEVIĆ, A. MARINCULIĆ, P. RAMADAN, T. PETRINOVIĆ, N. DŽAKULA (1998): Epizootiological Survey for Canine Visceral Leishmaniasis and the Isolation of the Protozoa *Leishmania infantum*. U: Abstract Book from 1st Croatian Congress on Infectious Diseases. October 1–3, Dubrovnik, Croatia, p. 106.

ŽIVIČNJAK, T., F. MARTINKOVIĆ, A. MARINCULIĆ, V. MRLJAK, N. KUČER, V. MATIJATKO, Ž. MIHALJEVIĆ, R. BARIĆ-RAFAJ (2005): A seroepidemiological survey of canine visceral leishmaniasis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet. Parasitol.* 131: 35–43.

ŽIVIČNJAK, T., F. MARTINKOVIĆ, R. BECK, A. MARINCULIĆ (2007) Canine Leishmaniasis Spread in Croatia: Feasibilities of PCR-Based and Serological Monitoring Activities. U: Abstract Book from International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED) 2007 23-25 February, Vienna, Austria, p. 118

***T. Živičnjak, F. Martinković, D. Lukačević, V. Mrljak, B. Goljak, V. Kutičić, Z. Bačetić:
SEROLOŠKI MONITORING LIŠMANIOZE PASA U HRVATSKOJ: OPCIJA ILI
NUŽNOST?***

SAŽETAK: Prikazani su rezultati serološke pretrage (indirektna imunofluorescencija) pasa na lišmaniozu tijekom prvih 9 mjeseci 2008. godine. Od klinički sumnjivih pasa, u enzootskoj regiji je 40,4 % serološki pozitivno, a u neenzootskoj 28,9 %, što je pokazatelj prvenstveno da su lokalni veterinari dobri dijagnostičari. Međutim, u enzootskom području je još 14,2 % asimptomatskih pasa također serološki pozitivno, što ukazuje na nužnost monitoringa cijele populacije pasa u enzootskom području, kao mjere suzbijanja ove zoonoze.

KLJUČNE RIJEČI: pas, lišmanioza, monitoring, L. infantum, Hrvatska

***T.Živičnjak, F. Martinković, D. Lukačević, V. Mrljak, B. Goljak, V. Kutičić, Z. Bačetić:
SEROLOGICAL MONITORING OF CANINE LEISHMANIOSIS IN CROATIA:
OPTION OR THE NECESSITY?***

ABSTRACT: Results of serological testing on canine leishmaniasis (indirect immunofluorescence) conducted during the first nine months in 2008 were shown. Among group of dogs suspected to have leishmaniasis, 40.4% were seropositive in enzootic region, while in non-enzootic region seropositive were 28.9 %. This indicates primarily that the

veterinarians have been well skilled in diagnostics. On the other hand, in the enzootic region 14,2% asymptomatic dogs were seropositive too. That indicates that monitoring among the whole canine population in enzootic area should be necessary in order to control this zoonosis.

KEY WORDS: *dog, leishmaniosis, monitoring, L. infantum, Croatia*