

КРВНИ РАЗМАЗ И ДИЈАГНОСТИКА ВЕКТОРСКИ ПРЕНОСИВИХ БОЛЕСТИ

Проф. др Милица Ковачевић Филиповић, др Јелена Француски Андрић*, асистент

Кратак садржај

Преглед крвног размаза има велики дијагностички значај у клиничкој пракси. Поред тога што представља брзу и јефтину методу на основу које добијамо увид у морфологију ћелија крви (еритроцита, леукоцита и тромбоцита), можемо одредити леукоцитарну формулу и добити семиквантитативну процену броја тромбоцита, можемо поставити дијагнозу неких векторски преносивих обољења као на пример: бабезиозе, хемоплазмозе, ерлихиозе или анаплазмозе и микрофилариозе. Дијагностика векторски преносивих болести се махом заснива на молекуларној идентификацији узрочника и серолошким испитивањима али крвни размаз представља прву методу избора у дијагностици ових обољења јер се брзо, лако и уз минимум материјалних улагања може његовим директним прегледом поставити коначна дијагноза. Даљом применом молекуларних метода и серолошких тестова одређују се врсте унутар идентификованих родова које изазивају горе поменута обољења.

Кључне речи: векторски преносиве болести, крвни размаз, мачка, пас

БАБЕЗИОЗА ПАСА:

Бабезиоза је протозоално обољење људи и животиња узроковано пироплазмамаза рода *Babesia* за чије појављивање и преношење је неопходно присуство инфицираног крпеља. Пироплазме обухватају два велика рода протозоалних паразита: *Babesia* и *Theileria*, који су међусобно фенотипски слични. Бабезије паразитирају искључиво у еритроцитима, док тајлерије паразитирају и у леукоцитима. Захваљујући развоју молекуларних метода попут PCR-а (*Polimerase chain reaction*) досада је описано преко 100 врста микроорганизама из рода *Babesia* различитих генотипова. На основу морфолошке фенотипизације *Babesia sp.* се деле на велике (3-7 μ m) и мале бабезије (1-3 μ m) (Табела 1). Прегледом крвног размаза светлосном микроскопијом оне се лако могу разликовати, али је немогуће утврдити врсту унутар ових група без примене молекуларних метода дијагностике. У зависности од фазе развојног циклуса у еритроцитима неке мале бабезије могу заузимати велике форме, а неке велике бабезије, могу изгледати мале, па се зато на основу микроскопске идентификације не може са сигурношћу тврдити да ли се ради о врсти бабезије која морфолошки припада великој или малој бабезији.

Бројна истраживања у земљама у окружењу и Европи вршена на су на овом пољу. У Словенији (Duh i sar., 2004), Румунији (Ionita i sar., 2012), Мађарској (Foldvari i sar., 2005), Пољској, Италији, Француској и Шпанији (Caccio i sar., 2002) идентификоване су врсте *B. canis canis* и *B. canis vogeli*, представници великих бабезија. Истраживање Beck i sar., 2011. у Хрватској указују на постојање *B. microti* код глодара, док су Бркљачић и sar., 2010. код паса идентификовали само *B. canis canis. Babesia. gibsoni* као представник мале бабезије идентификована је у Италији, Шпанији и Немачкој. Због велике присутности

ових крвних паразита у Европи истраживања о заступљености *Babesia sp.* у популацији паса у Србији су врло значајна са епизотиолошког и клиничког аспекта.

Први корак у постављању дијагнозе представља идентификација узрочника светлосном микроскопијом у размазу капиларне крви. Ова метода је једноставна, јефтина и високо специфична за доказивање *Babesia sp.* у еритроцитима, али има малу осетљивост, јер је праг детекције светлосним микроскопом око 0,001% паразитемије (Birkenheuer, 2012). На крвном размазу велике бабезије се уочавају у виду сузе или крушколиких облика у пару, а мале бабезије у виду појединачних прстенастих облика. У појединим случајевима, (у фази брзе деобе паразита), запажа се присуство атипичних, амeboидни облика паразита различите величине. Када се на размазу капиларне крви светлосном микроскопијом идентификују бабезије на основу својих фенотипских карактеристика није потребно примењивати друге лабораторијске методе дијагностике у циљу постављања дијагнозе. Уколико се светлосном микроскопијом не уочи присуство ових паразита у еритроцитима, а сумња се да је животиња инфицирана бабезијом, потребно је применом серолошких (ELISA-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) и молекуларних метода дијагностике (PCR - Polymerase Chain Reaction, ISH - In Situ Hybridisation) доказати њихово присуство.

Табела 1. Најчешће врсте рода *Babesia*, морфолошке карактеристике, вектори и њихова географска дистрибуција. (Adam J. Birkenheuer, *Infectious disease of the dog and cat, Babesiosis*, 2012)

Врсте рода <i>Babesia</i>	Вектори	Морфолошке карактеристике	Дистрибуција вектора
<i>Babesia canis vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Велика, у виду једне или две сузе	Африка, Азија, Аустралија, Европа, Северна и Јужна Америка
<i>B. canis canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Велика, у виду једне или две сузе	Европа
<i>B. canis rossi</i>	<i>Haemaphysalis elliptica</i>	Велика, у виду једне или две сузе	Африка
<i>B. gibsoni</i>	<i>Haemaphysalis bispinosa</i> <i>Haemaphysalis longicornis</i>	Мала, прстенастог облика	Африка, Азија, Аустралија, Европа, Јужна и северна Америка
<i>B. microti</i>	<i>Ixodes hexagonus</i>	Мала, прстенастог облика	Шпанија
<i>B. caballi</i>	Није утврђено	Мала, прстенастог облика	Хрватска

ЕРИЛИХИОЗА И АНАПЛАЗМОЗА ПАСА:

Рикеције које проузрокују ерлихиозу и анаплазмозу су класификоване као бактерије у оквиру групе α -протобактериа. Рикеције се налазе између вируса, који су облигатни интрацелуларни организми, и бактерија, које користе кисеоник, имају метаболичке ензиме, осетљиве су на неке антибиотике, и имају ћелијске зидове. Чланови α -протобактериа, у оквиру породице *Rickettsiaceae* и *Anaplasmataceae*, реда *Rickettsiales*, су рекласификовани у 2001. години. Рекласификацијом која је извршена на основу

молекуларне анализе и секвенционирања гена, родови *Ehrlichia* и *Wolbachia* су пребачени из породице *Rickettsiaceae* у породици *Anaplasmataceae*. Родови *Rickettsia* и *Orientia* остали су у породици *Rickettsiaceae*. Поред тога, врсте које су претходно укључене у род *Ehrlichia* (*Ehrlichia phagocytophilum*, *Ehrlichia equi*, и *Ehrlichia platys*) су премештени у роду *Anaplasma* и *Ehrlichia risticii* и *Ehrlichia sennetsu*, су премештени у род *Neorickettsia*.

У леукоцитима паса се може уочити присуство паразитских инклузија тзв. морула *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* и *Anaplasma phagocytophilum*. Интрацелуларне моруле се уочавају на размазу периферне крви у цитоплазми леукоцита као еозинофилна или базофилна телашца округлог до овалног облика. Моруле *E. ewingii* и *A. phagocytophilum* се најчешће уочавају у неутрофилним гранулоцитима, за разлику од морула *E. canis* које се најчешће уочавају у макрофагама и моноцитима и детектују се у периферној крви врло ретко у раној фази болести. Присуство морула *Ehrlichia sp.* се може уочити у моноцитима и лимфоцитима синовијалне течности паса у случајевима артритиса. На основу налаза морула у цитоплазми леукоцита на размазима телесних течности можемо тврдити да се ради о анаплазмози или ерлихиози али је неопходно применом других дијагностичких метода (брзи дијагностички тестови, серолошка испитивања, PCR) доказати која врста моруле је уочена у цитоплазми леукоцита.

Anaplasma platys (*A. platys*) је интрацелуларна бактерија која за разлику од *Anaplasma phagocytophilum* и *Ehrlichia sp* који инфицирају леукоците, по продору у организам инфицира тромбоците. Пси могу имати благу (Harvey, 2012) до тешку клиничку форму болести са смртним исходом. Налаз *A. platys* је први пут описан 1978. године на Флориди, а од 2000. године има све више описаних случајева у земљама медитеранског басена и Источне Европе). У Србији нису званично описани случајеви инфекције овом бактеријом, али је на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду током 2012. и 2013. године забележено више случајних налаза *A. platys* приликом прегледа крвних размаза (необјављени резултати, Ковачевић Филиповић и Француски, 2013).

A. platys улази у тромбоците ендоцитозом и после бојења размаза *May Grünwald Giemsa-om* или *Diff-Quick-om*, може се уочити као тегет инклузија величине 0,3 до 1 μm . *A. platys* се дели у самим тромбоцитима и формира колоније ограничене мембраном, које се називају моруле. Један тромбоцит може да има од једне до петнаестак морула. Инкубациони период, после експерименталне интравенске инокулације бактерије, је око 10 до 15 дана, а тада се може уочити и највећи број инфицираних тромбоцита у крви. Код паса се јавља циклична тромбоцитопенија. Број тромбоцита опадне и врати се у физиолошке вредности у циклусима од 10 до 15 дана (Harvey, 2012). Временом, тромбоцитопенија се више не може детектовати (Harvey, 2012). Нова истраживања показују да се по инфекцији имунокомпетентних паса серопозитивност јавља око 15. дана по инфекцији. Серопозитивност се може појавити и касније уколико је животиња истовремено инфицирана већим бројем различитих микроорганизама. Уколико је животиња инфицирана само са *A. platys* након, у просеку, 160 дана, долази до губитка серопозитивности, и микроорганизми се не могу детектовати PCR-ом у крви, односно не може се показати циклична тромбоцитопенија. Међутим, не може се искључити могућност да микроорганизми ипак опстају у макроорганизму и да се могу реактивирати када животињи падне имунитет. Иницијална тромбоцитопенија може настати као последица размножавања микроорганизама у тромбоцитима, али се сматра да касније епизоде тромбоцитопеније настају као последица имунолошки посредованих механизма.

Лабораторијске анализе показују тромбоцитопенију, понекад пролазну леукоцитозу која се јавља заједно са паразитемијом и благо нормоцитно-нормохромну анемију, која се јавља као последица хроничне инфламације. У литератури је описан велики број случајева природне инфекције паса који су истовремено инфицирани већим бројем микророганизма, који се преносе путем крпеља па стога налаз *A. platys* у тромбоцитима на крвном размазу треба ветеринару да укаже на могуће присуство других векторски преносивих бактерија, које се не могу уочити овом једноставном методом. *A. platys* се може дијагностивати на крвном размазу обојеном *May Grünwald Giemsa-om* или *Diff-Quick-om*. Могући су лажно негативни налази, али и лажно позитивни налази уколико се у тромбоцитима нађу изразито обојене грануле или инклузије пореклом од неког другог микроорганизма или преципитате боје. Међутим, и лажно позитивни, и лажно негативни налази нису превише чести.

ХЕМОПЛАЗМОЗА ПАСА И МАЧАКА

Хемотропне микоплазме или хемоплазме (*Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma wenyonii*, *Candidatus Mycoplasma haemobovis*, *Mycoplasma ovis i dr*) су грам-негативне бактерије које паразитирају приљубљене уз спољашњу мембрану еритроцита код свих до сада испитиваних врста домаћих и дивљих сисара: мачака, паса, говеда, свиња, оваца и коза, дивљих мачака, пацова, медведа, камила, лисица и код људи. Преносе се путем бува и крпеља, мада начин преношења није у потпуности испитан и како су хемоплазме нађене и у плувачци и у фецесу, претпоставља се да се могу пренети и пероралним путем (Willi i sar, 2007). Такође се претпоставља да постоји могућност преношења хемоплазми између глодара, мачака и паса (Willi i sar., 2007).

Најчешће не доводе до клинички манифестиних знакова болести, али уколико су животиње на неки начин имунокомпромитоване, хемоплазме могу да испоље свој патогени ефекат који се огледа у убрзаној хемолизи и последичној анемији. Претпоставља се да су неке од хемоплазми нађених код животиња зоонозе, мада за то још увек не постоје чврсти докази. Ипак, у руралним крајевима Кине у којима је код свиња и код говеда преваленца хемоплазме око 80%, јако је висока преваленца овог инфективног агенса и код људи - око 40 до 50% .

Међу кућним љубимцима, хемоплазма је важна као узорчник инфективне анемије мачака. Иако је први рад који бележи појаву инфективне анемије мачака датира још из 1959. године, интересовање за ове бактерије је заправо обновљено од 2002. године, односно од када је PCR постала доступна за дијагностику овог инфективног агенса. PCR је златни стандард за детекцију овог микроорганизма. У ери пре PCR-а, за дијагнозу инфективне анемије било је потребно извршити преглед крвног размаза. Та метода, иако једноставна и економична и необично важна у ветеринарској медицини, ипак није погодна за детекцију хемоплазми, с једне стране због мале величине ове бактерије (0,2 до 2 μ m) и њеног тешког уочавања на размазу, а са друге стране због тога што се хемоплазме не налазе увек у периферној циркулацији и лако се одвајају од зида еритроцита уколико крв дуже стоји пре прављења размаза. Од 2002. године објављено око 100 радова у којима се могу наћи подаци о преваленци овог инфективног агенса код мачака и других сисара, али релативно мали број радова је посвећен патогенези анемије. Увођење PCR дијагностике је

довело и до рекласификације хемоплазми. До 2002. године се сматрало да узрочници инфективне анемије спадају у ред рикеција (напуштени називи *Hemobartonella* и *Eperythrozoon*), али по новој класификацији ове бактерије спадају у ред микоплазми.

Хемоплазма мачака:

Код мачака су до данас утврђена три различита субтипа хемотропних микоплазми које изазивају инфективну анемију. У њих спадају *Mycoplasma haemophilis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* и *Mycoplasma turicensis*. Претходно су ови микроорганизми сврставани у *Haemobartonella*-е. Животиње код којих настаје екстравакуларна или интраваскуларна хемолитичка анемија услед дејства ових бактерија, најчешће су FIV или FeLV позитивне. Једино *Mycoplasma haemophilis* може изазвати тешку, понекад фаталну инфекцију код имунокомпетентних мачака. Прелиминарна испитивања указују да је осетљивост на антибиотике различита између наведених субтипова. Дијагноза се може поставити прегледом размаза крви (осетљивост методе 20%) уколико се микоплазме налазе у циркулацији, приљубљене уз мембрану еритроцита. На крвном размазу се могу видети као кокоидне, прстенасте или чак и штапићасте форме, распоређене појединачно или у низу. Осим самих бактерија, на размазу се може уочити полихроматофилија, макроцитоза и нормохромија. Доста еритроцита садржи Howell-Jolly-ева телашца, а некад се може наћи и доста еритробласта (Willi и сар., 2007). Најчешће, без обзира на инфекцију ових микроорганизма, они се не могу наћи на крвном размазу и животиње је потребно тестирати PCR или серолошким методама.

Код мачака се преваленца креће од око 10 до 30%. Чешће се среће код одраслих мужјака који живе ван куће које су у спољашњој средини. У студији изведеној у Србији у којој је сакупљено 380 крви мачака показано је су 62 (16%) мачке позитивне на хемоплазму. Од 62 мачке које су биле позитивне 9 (14,2%) мачака је било анемично. Од тога је 8 мачака било благо анемично (Хематокрит = $19,7 \pm 4\%$), а само једна је имала Ht=11%. Међу мачкама које нису имале хемоплазму (293 мачке) било је 18 (6%) анемичних мачака, од чега су две биле тешко анемичне (Ht<11%). Са *M. haemominutum* је било инфицирано 46 мачака, са *M. turicensis* 20 мачака и са *M. haemofelis* 2 мачке. Укупно је било 4 мачке инфициране са све три врсте хемоплазме од чега су 2 биле анемичне, а две нису биле анемичне. 14 мачака је било инфицирано са 2 врсте хемоплазме. Ово подаци указују да је преваленца хемоплазме уједначена широм света.

Хемоплазмоза паса:

Mycoplasma haemocanis (*Haemobartonella canis*) и *Mycoplasma candidatus haematoparvum* су узрочници хемоплазме паса. Имају посебну структуру јер формирају дугачке ланце у виду ситних тачкица на површини еритроцита. Уколико се непосредно по узорковању крви не направи крвни размаз микоплазме ће се "откачити" од еритроцита. Приликом прегледа крвног размаза артефакти боје се лако могу прогласити за микоплазме па је зато за постављање дијагнозе на основу размаза периферне крви потребно искуство. Инфекција је најчешће асимптоматска, али се може јавити анемија у акутној фази болести. Налаз хемотропних микроорганизма на размазу периферне крви је редак код паса изузев код спленектомисаних и имуносупримираних јединки.

ДИРОФИЛАРИОЗА ПАСА И МАЧАКА

Дирофилариоза је векторски преносива зооноза изазвана кардиопулмоналном нематодом, *Dirofilaria immitis* (Rivaldi и сар., 2013).

Dirofilaria immitis, *Dirofilaria repens*, и *Acanthocheilonema reconditum* (ранији назив *Dipetalonema reconditum*) изазивају инфекцију код домаћих, дивљих животиња и људи широм света. Иако су каниде (пси, којоти, лисице, вукови) прави домаћини за срчаног црва, паразит је пронађен код више од 30 врста животиња, укључујући и домаће и дивље мачаке, медведе, ласице, феретке, морске лавове и људе.

Дирофилариоза је последњих деценија постала широко распрострањена због глобалних климатских промене услед глобалног загревања, промена у сезонској динамици вектора и кретања животиња. Ови фактори играју кључну улогу у недавном порасту географског ширења болести. Дирофилариоза је први пут регистрована у Србији у 1989. од стране Милосављевић и Кулишић (Milosavljević и сар., 1989). Неколико студија након потврдило је присуство обе врсте Д. репенс и Д. иммитис, али још увек нема података о свим присутним врстама рода Дирофиларија као ни о присуству вектора који их преносе. У последњих неколико година, број оболелих људи и животиња је у порасту у Европи (Rivaldi и сар., 2013, као и у Србији).

Већина објављених студија је фокусирано на молекуларној идентификацији и географској распрострањености Дирофиларија врста. Нажалост, мали број студија показују хематолошке промене због недостатка непостојања посебних лабораторијских абнормалности и клиничких знакова који указују на постојање болести. Најчешћи забележене хематолошке промене код паса са испољеним клиничким знацима су: анемија, тромбоцитопенија, еозинофилија, басофилија, моноцитоза и повремено неутрофилија (Harvey., 2012).

Dirofilaria immitis, *Dirofilaria repens* и *Dipetalonema reconditum* су паразити који се могу наћи код паса и мачака, а који као развојне стадијуме имају микрофиларије које се могу наћи у периферној крви, односно на крвном размазу. Од највећег клиничког значаја је налаз микрофиларија *D.immitis*, чији одрасли облици код паса и мачака изазивају болест срчаног црва. Без обзира на налаз микрофиларија на крвном размазу, или на налаз микрофиларија у крви модификованим Кнотт-овим тестом, дијагноза дирофилариозе се преваходно поставља серолошким тестом који детектује антигене присутне на одраслим облицима женки *D.immitis*. Услед промена климатских фактора последњих година расте инциденца појаве дирофилариозе у Србији. У појединим регионима Србије су претходних година у неколико наврата прављене студије о заступљености *D.immitis*. Једна од последњих у низу је обављена током лета 2011. године када је спроведено истраживање на 387 случајно изабраних паса у неколико крајева Србије. У Београду су добијени следећи подаци: у централним општинама *D.immitis* је била заступљена са 5% (2/41), на Новом Београду скоро 7% (2/30), у Земуну 10% (3/30), а у Борчи и Овчи 55% (34/62). У Новом Саду *D.immitis* је дијагностикована код 5% (3/60), а Смедереву код 47% (14/30) испитаних паса. Висок степен инфестације са *D.immitis* уочен је и код службених паса јединица

МУПА Србије где је од укупно 80 испитаних, 17.5% (14/80) било позитивно на присуство микрофиларија, модификованим Кнотт-овим тестом, 10% (8/80) било позитивно на присуство диروفиларија брзим серолошким тестовима, а мешовита инфестација, микро и диروفиларијама уочена је код 10% испитаних паса (8/80) (необјављени резултати, Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду). Ови налази су веома важни јер показују да инфестација са *D.immitis* у Србији може бити значајна диференцијална дијагноза код многих паса са кардиопулмоналним обољењима, али и да је у појединим регијама потребно систематско тестирање клинички здравих животиња.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beck R; Vojta L; Curković S; Mrljak V; Margaletić J; Habrun B. (2011): Molecular survey of *Babesia microti* in wild rodents in central Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11 (1), 81-3.
2. Birkenheuer AJ.: Infectious disease of the dog and cat, Babesiosis, 2012.
3. Caccio S.M; Antunovic B; Moretti A; Mangili V; Marinculic A; Baric R.R; Slemenda S.B; Pieniazek N.J. (2002): Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet. Parasitol.* 106, 285–292.
4. Duh D; Tozon N; Petrovec M; Strašek K; Županc T. (2004): Canine babesiosis in Slovenia: Molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet. Res.* 35, 363–368.
5. Foldvari G; Hell E; Farkas R. (2005): *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. *Veterinary Parasitology* 127, 221–226.
6. Harvey J. (2012): Evaluation of Leukocytic Disorders. In: *Veterinary Hematology a diagnostic guide and color atlas.* Elsevier Saunders, St Luis, 122-177.
7. Ionita M; Mitrea IL; Pfister K; Hamel D; Buzatu CM; Silaghi C. (2012): Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: a molecular approach. *Parasitology research* 11 (5), 1659-1664.
8. Milosavljević P; Kulišić Z. (1989): Prvi slučaj dirofilarioze u Jugoslaviji. *Veterinarski glasnik*, 43 (1), 71-76.
9. Rivaldi L., Cringoli G., Venco L., Genchi C. (2013): Dirofilariosis of dog and cat. In: *Guide to vector borne disease of pets.* Merial, Lyon, France, 327-342.
10. Willi B; Boretti FS; Tasker S; Meli ML; Wengi N; Reusch CE; Lutz H; Hofmann-Lehmann R. (2007): From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights. *Vet Microbiol.* 125, 197-209.