

LEJŠMANIOZA: PRELIMINARNI REZULTATI SEROPREVALENCE PRI PSIH V SLOVENIJI

Brane Krt, Aleksandra Vergles Rataj, Igor Gruntar, Tina Kotnik*

Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

tina.kotnik@vf.uni-lj.si

Lejšmaniozo pri psih in pri ljudeh povzročajo protozoji iz rodu *Leishmania*, od katerih je najpomembnejša vrsta *L. infantum*. Prenašalci so samice peščenih muh iz družine *Psychodidae*, poddružina *Phlebotominae*. Klinično se lejšmanioza pri psih kaže s kožnimi spremembami (vozlički na gobcu, nosu, uhljih ter ekfoliativni dermatitis z nenormalno rastjo krempljev) in sistemskimi spremembami (anoreksija, anemija, mišična atrofija, poliartropatija, generalizirana limfadenopatija, konjunktivitis, blefaritis, anteriorni uveitis in keratokonjunktivitis ter spontane krvavitve, zlasti krvavitve iz nosu). Pri atipični obliki bolezni je opisanih še mnogo simptomov, izraženih na različnih organskih sistemih. Z imunofluorescenčno metodo smo preiskali 110 naključno izbranih serumskih vzorcev psov iz različnih krajev Slovenije, odvzetih od sredine leta 2014 do maja 2016. V 6 vzorcih (iz krajev Dutovlje, Ljubljana, Križe, Bistrica ob Dravi, Križevci pri Ljutomeru in Lenart v Slovenskih goricah) smo dokazali protitelesa, tri vzorce pa smo ocenili kot sumljive (iz Ankarana, Ljubljane in Doba-Krtine) vendar je število preiskanih vzorcev v naši raziskavi premajhno, da bi lahko bolj zanesljivo ocenili stopnjo seroprevalence lejšmanioze pri psih v Sloveniji. Posredno smo dokazali prisotnost povzročitelja. Nedavno so ugotovili prisotnost peščenih muh na območju slovenske Istre, zato je le še vprašanje časa, kdaj bomo ugotovili prve primere endemične lejšmanioze pri ljudeh in živalih v Sloveniji.

Ključne besede: lejšmanioza; psi; seroprevalenca; Slovenija

Uvod

Lejšmanioza je vektorsko prenosljiva bolezen, ki jo povzročajo protozojski paraziti iz rodu *Leishmania*. V rodu je približno 30 vrst, od katerih je 20 patogenih za ljudi, 10 pa za pse. Najbolj razširjena in raziskana je okužba z vrsto *L. infantum*, ki povzroča okužbe psov in drugih kanid ter ljudi. Prenašalci so nematocerne žuželke, samice peščenih muh iz družine *Psychodidae*, poddružina *Phlebotominae*. Na področju Evrope so to predstavniki rodu *Phlebotomus*. Lejšmanioza je bila ugotovljena tudi pri mačkah (1), konjih (2), lisicah, kojotih in glodavcih. Pri naštetih vrstah živali bolezen ugotavljamo razmeroma redko, pomemben rezervoar pa v zadnjem času postajajo glodavci, saj je bila pri podganah v endemičnem področju (južna Italija) ugotovljena skoraj 60% seroprevalenca (3). Peščene muhe se okužijo z zaužitjem krvi vretenčarjev, invadiranih z amastigoti parazita (oblika brez bička, značilna za vretenčarje). V črevesju muh se iz amastigotov izoblikujejo promastigoti (bičkaste oblike protozoja, velikosti 10-12 μm), ki se razmnožujejo z vzdolžno delitvijo. Kopičijo se v slinskih žlezah muhe. Ob piku samice peščene muhe vnesejo promastigote v kri vretenčarja. Promastigoti odvržejo biček in jih kot amastigote, velike 2-3 μm , fagocitirajo makrofagi. V njih se z vzdolžno delitvijo ponovno razmnožujejo in raznesejo po organizmu gostitelja.

Okuženi makrofagi занесеjo amastigote v regionalne bezgavke. Od tod naprej je izid okužbe pri psih odvisen od mnogih dejavnikov, ki se nanašajo na prenašalca (ponavljajoči se piki okuženih samic peščene muhe), zajedavca (virulenca) in gostitelja (genetska podlaga, celična in humoralna imunost s proizvodnjo citokinov, vzporedne bolezni). Od teh dejavnikov je odvisno, ali se bo okužba razvila v klinično obliko bolezni ali ne. Parazite lahko imunski odziv gostitelja v bezgavkah uniči (samoozdravitev), lahko ostanejo omejeni le na kožo in bezgavke (nediseminirana in običajno asimptomatska okužba), ali pa se s pomočjo makrofagov razširijo po telesu (diseminirana okužba), kar ima spet lahko za posledico klinične znake bolezni (simptomatska okužba), ali pa kliničnih znakov ni (diseminirana asimptomatska okužba). Nedvomno je pojav klinične oblike bolezni verjetnejši po več sezonah, ki jih psi na endemičnih področjih preživijo ponoči na prostem. Okuženi psi so pomembni kot rezervoar bolezni. Pri ljudeh se okužba z *L. infantum* kaže predvsem v visceralni obliki (visceralna lejšmanioza, VL), ki je smrtno nevarna bolezen, če je ustrezno ne zdravimo.

Tradicionalna endemična področja bolezni v EU so v državah Mediteranskega bazena (Portugalska, Španija, Francija, Italija, Hrvaška, Bolgarija, Romunija, Grčija in Ciper), z incidenco okrog 700 novih primerov VL letno pri ljudeh. Izven EU je bolezen razširjena na vseh kontinentih, razen na Antarktiki in v Avstraliji. V zadnjih letih beležimo širjenje endemičnih področij severno od obstoječih, najverjetneje zaradi globalnega segrevanja in povečanega gibanja živali na območja ter z območij, kjer je bolezen endemična. Okužbe pri ljudeh so dokazane v Avstriji, centralnem delu Francije in Nemčiji, od koder poročajo tudi o okužbi otroka, ki ni nikoli potoval v znana endemična območja. V Dalmaciji so bili prvi primeri lejšmanioze pri ljudeh in živalih ugotovljeni že leta 1930. Od leta 1997 beležijo naraščanje primerov lejšmanioze pri psih. Seroprevalenca pri zdravih psih, ki živijo na endemičnih področjih EU, se giblje od 5-43% kar pomeni, da je na teh območjih lahko okuženih med 40-80% psov. Nedavne entomološke raziskave na Hrvaškem so dokazale prisotnost dveh vrst vektorjev okužbe, *Phlebotomus neglectus* in *P. tobbi*; prvi je mnogo bolj zastopan (75,9%) in pogostejši tam, kjer so psi (4). Nedavno so ugotovili tudi serološko pozitivne primere pri ljudeh, ki živijo v Istri.

Klinično se lejšmanioza pri psih kaže s kožnimi spremembami na mestu vboda insekta (vozličaste lezije, najpogosteje jih najdemo na gobcu, nosu in notranji strani ušes), nesrbečim eksfoliativnim dermatitisom (po raznosu zajedavca z makrofagi), pogosta je tudi nenormalna rast krempljev (onihogrifoza). Anoreksija se pojavi zaradi kronične ledvične odpovedi in ta je tudi glavni vzrok smrti pri psih, obolelih za lejšmaniozo. Psi so videti utrujeni, potrti in šibki, kar so posledice anemije, mišične atrofije in poliartropatije. Pogost simptom lejšmanioze je generalizirana limfadenopatija, značilne so tudi spremembe na očeh v obliki konjunktivitisa, blefaritisa, anteriornega uveitisa in keratokonjunktivitisa ter spontane krvavitve, zlasti iz nosu. Pri atipični obliki bolezni je opisanih še mnogo simptomov, izraženih na različnih organskih sistemih.

Na klasičen način dokazujemo povzročitelja s citološko preiskavo izpirkov ali odtisov ulcerativnih sprememb, aspiratov (tankoigelna biopsija) nodulov ali krvnih razmazov, pri čemer v makrofagih iščemo amastigote. Serološka diagnostika (imunofluorescenčni in encimskoimunski test) je najzanesljivejša pri živalih z izraženimi simptomi bolezni, manj pri asimptomatsko okuženih. Če pregledujemo poginjeno žival, iz vzorcev jeter, vranice in kostnega mozga naredimo razmaze za citološko preiskavo oziroma odvezamemo tkivo za patohistološko preiskavo. Sicer pa se za dokaz povzročitelja v zadnjem času vse bolj uporabljajo molekularne metode (PCR).

Namen našega dela je bil ugotoviti seroprevalenco pri psih iz različnih krajev Slovenije in na osnovi tega sklepati na prisotnost lejšmanije. To je skladno tudi s priporočili European Food Safety Authority (5).

Material in metode

Z imunofluorescenčno metodo smo preiskali 110 naključno izbranih serumskih vzorcev psov iz različnih krajev Slovenije: Ankaran, Bistrica ob Dravi, Bled, Brestanica (2 vzorca), Brezovica pri Ljubljani, Brusnice, Celje, Črni kal, Črnomelj, Dob-Krtina, Dobova, Dobrova (2), Dolenjske Toplice, Domžale (2), Dutovlje, Grosuplje (3), Ilirska Bistrica, Ivančna Gorica, Jesenice (2), Kamna Gorica, Kamnica (2), Kamnik (3), Kobarid, Kočevje, Komenda, Koper (3), Kranj (2), Križe (2), Križevci pri Ljutomeru (2), Lenart v Slovenskih goricah, Ljubljana (9), Log pri Brezovici, Logatec, Lokev, Lukovica pri Brezovici, Mačkovci, Mala Nedelja, Maribor (4), Marjeta na Dravskem polju, Markovci pri Ptujju, Mavčiče, Novo mesto (2), Postojna, Pragersko, Preddvor, Preserje pri Brezovici (2), Ptuj (3), Radovljica (3), Ribnica, Selnica ob Dravi, Sežana (2), Sp. Besnica, Sp. Duplek, Stahovica, Starše, Šenčur, Šentilj, Šentvid pri Stični, Škofja Loka (2), Škofljica, Šmarje Sap, Tenetiše, Trbovlje, Trzin (2), Tržič, Velenje (2), Verd, Videm Dobrepolje, Vir, Višnja Gora, Vodice, Zg. Besnica in Zg. Jezersko. Te vzorce smo sicer prejeli v preiskavo zaradi suma na lymsko boreliozo in/ali granulocitno anaplazmozo, od sredine leta 2014 do maja 2016. Test smo izvedli na komercialno pripravljenih stekelcih (Leishmania-Spot IF, Biomerieux, Francija), skladno z navodili proizvajalca. Antipasji FITC konjugat (Sigma, ZDA) smo redčili 1:32. Kot pozitivne smo ocenili tiste vzorce, pri katerih je bila reakcija pozitivna pri redčenju 1:50.

Rezultati

Med 110 preiskanimi serumi je bilo 6 pozitivnih, in sicer iz krajev Dutovlje, Ljubljana, Križe, Bistrica ob Dravi, Križevci pri Ljutomeru in Lenart v Slovenskih goricah. Tri vzorce smo ocenili kot sumljive, poslani pa so bili iz Ankarana, Ljubljane in Doba-Krtine.

Razprava

V raziskavi smo uporabili vzorce, ki so bili poslani v preiskavo za druge namene (boreliozna, anaplazmoza). Zato podatkov o morebitnih kliničnih znakih, ki bi jih lahko povezali z lejšmaniozo, in podatkov o potovanju teh psov v endemična področja, nimamo. Naš namen je bil ugotoviti seroprevalenco pri psih iz različnih krajev Slovenije in na osnovi tega sklepati na prisotnost lejšmanije, ki se bo ob selitvi peščene muhe proti severu lahko začela prenašati tudi znotraj države. Nedavno objavljena raziskava, narejena na območju hrvaške in slovenske Istre, namreč dokazuje prisotnost petih vrst peščenih muh na tem območju (*Phlebotomus neglectus*, *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. mascitii*, *Sergentomyia minuta*). Našli so jih predvsem v okolici divjih smetišč, kjer so našli tudi podgano, okuženo z *L. infantum* (3). V preiskanih peščenih muhah na območju slovenske Istre raziskovalci sicer niso ugotovili prisotnih zajedavcev, vendar je znano, da je peščena muha vrste *P. neglectus* najpomembnejša in najpogostejša prenašalka zajedavca *L. infantum*. Dolgoletne izkušnje držav z endemično obliko lejšmanioze in številne raziskave kažejo, da je za prenos zajedavca, poleg prisotnosti vektorjev na določenem območju, pomembna predvsem koncentracija okuženih ljudi in živali. Ko število okuženih psov doseže določeno koncentracijo, se prične endemični prenos bolezni. Vse več objav pa navaja kot možen rezervoar bolezni tudi mačke in glodavce. Število preiskanih vzorcev v naši raziskavi je sicer premajhno, da bi lahko bolj zanesljivo govorili o stopnji seroprevalence lejšmanioze v Sloveniji, posredno pa smo dokazali prisotnost okuženih psov. V državah z dolgoletno endemično obliko bolezni ugotavljajo, da je razmerje med simptomatsko okuženimi psi in asimptomatskimi prenašalci bolezni lahko do 1:100.

Države Evropske unije, ki mejijo na države z endemično obliko bolezni (mednje sodi tudi Slovenija), imamo možnost zaježitve širjenja endemične oblike lejšmanioze. To lahko storimo s pomočjo izobraževanja in rednega obveščanja veterinarjev in zdravnikov, hitrega ugotavljanja in zdravljenja bolezni pri živalih in ljudeh, ozaveščanja lastnikov živali, preprečevanja širjenja vektorjev bolezni ter končno tudi zaščitnega cepljenja psov. V nekaterih državah EU je že registrirano cepivo za pse (CaniLeish, Virbac Animal Health), ki se je v dosedanjih raziskavah izkazalo za učinkovito tako pri preprečevanju okužbe kot tudi profilaktično, saj so uspeli s cepljenjem bolnih psov konvertirati njihov imunski status v bolj učinkovit celični imunski odziv, ki lahko prepreči visceralno obliko bolezni.

Zaključek

Glede na dejstvo, da vedno več lastnikov psov s svojimi živalmi potuje v endemična območja in glede na uvoz okuženih psov z endemičnih področij, prisotnost vektorjev bolezni in spremembe klime, je samo še vprašanje časa, kdaj bomo tudi v Sloveniji začeli beležiti prve primere endemične lejšmanioze pri ljudeh in živalih. Opozorjanje veterinarske in medicinske stroke na ugotovljena dejstva je torej upravičeno.

Reference

1. Maia C, Nunes M, Campino L. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 2008; 8: 555–60.
2. Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Serra R et al. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Vet J* 2003; 35: 320–3.
3. Ivočić V, Kalan K, Zupan S, Bužan E. Illegal waste sites as a potential micro foci of mediterranean leishmaniasis: first records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Slovenia. *Acta Veterinaria Beograd* 2015; 65 (3): 348-57.
4. Živičnjak T, Martinković F, Houry C et al. Serological and entomological studies of canine leishmaniasis. *Vet. arhiv* 2011; 81: 99-110
5. EFSA Panel on Animal Health and Welfare, 2015. Scientific Opinion on canine leishmaniasis. *EFSA Journal* 2015; 13(4): 4075

Leishmaniasis: preliminary results of seroprevalence in dogs in Slovenia

Canine Leishmaniasis (CanL) and human visceral leishmaniasis (VL) cause protozoa from genus *Leishmania*. The most important species is *L. infantum*. Vectors are sand flies from *Psychodidae* family, subfamily *Phlebotominae*. CanL is presented by skin symptoms (nodules on the muzzle, nose, pinnae, exfoliative dermatitis with onichogryphosis) and general health changes (anorexia, anemia, muscle atrophy, poliartropathy, generalised lymphadenopathy, conjunctivitis, blepharitis, anterior uveitis, keratoconjunctivitis and spontaneous nasal bleeding). Serum specimens of 110 dogs, living in different parts of Slovenia, were collected from mid of year 2014 till May 2016 and tested by immunofluorescent method. Six positives were found (living in Dutovlje, Ljubljana, Križe, Bistrica ob Dravi, Križevci pri Ljutomeru and Lenart v Slovenskih goricah). Three specimen, sent from Ankarán, Ljubljana and Dob-Krtina, were marked as suspicious. Number of tested specimen is too low that authors would be able to estimate CanL seroprevalence

in Slovenia. Nevertheless, *L. infantum* was indirectly proven. Since presence of important vectors was reported from slovenian Istria region recently, authors would like to stress the matter of time until the first endemic CanL or VL case in Slovenia will be reported.

Key words: leishmaniosis; CanL; dogs; seroprevalence; Slovenia