



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Damir Lukačević

**PRAĆENJE LIŠMANIOZE PASA
PRIMJENOM RAZLIČITIH KOMBINACIJA
DIJAGNOSTIČKIH METODA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Damir Lukačević

**MONITORING OF CANINE
LEISHMANIOSIS USING DIFFERENT
COMBINATIONS OF DIAGNOSTIC
METHODS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

DAMIR LUKAČEVIĆ

**PRAĆENJE LIŠMANIOZE PASA
PRIMJENOM RAZLIČITIH KOMBINACIJA
DIJAGNOSTIČKIH METODA**

DOKTORSKI RAD

MENTORI:

Prof.dr.sc. Tatjana Živičnjak

Dr. sc. Relja Beck, viši znanstveni suradnik

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Damir Lukačević

**MONITORING OF CANINE
LEISHMANIOSIS USING DIFFERENT
COMBINATIONS OF DIAGNOSTIC
METHODS**

DOCTORAL THESIS

REVISORS:

Tatjana Živičnjak, DVM, PhD, Associate Professor

Relja Beck, DVM, PhD, Senior Research Associate

Zagreb, 2013.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorima, prof.dr.sc. Tatjani Živičnjak i dr.sc. Relji Becku na savjetima i pomoći tijekom izrade ove disertacije.

Hvala mojoj obitelji.

SAŽETAK

PRAĆENJE LIŠMANIOZE PASA PRIMJENOM RAZLIČITIH KOMBINACIJA DIJAGNOSTIČKIH METODA

Svrha ovog istraživanja bila je molekularnim i serološkim metodama pretražiti uzorke krvi naizgled zdravih pasa koji žive u poznatim žarištima enzootskog područja, izvan tih žarišta i u graničnim područjima, te dobiti uvid u stupanj raširenosti lišmanioze.

Cilj je također bio istražiti mogućnosti kombiniranja dijagnostičkih metoda različitih osjetljivosti i specifičnosti te standardizirati protokol koji će omogućiti implementaciju kvalitetnog praćenja lišmanioze pasa, kako u enzootskom području, tako i na područjima gdje se bolest dosad nije pojavljivala.

Pretraživanjem na području tri dalmatinske županije obuhvaćena su ukupno 242 naizgled zdrava psa, raznih pasmina i kategorija, od čega su najzastupljeniji bili lovački. Svi uzorci su testirani primjenom četiri serološke i tri molekularne metode, te su rezultati uspoređeni i statistički obrađeni. Prvom primjenom multiplog simultanog testiranja u enzootskom području, postigli smo otkrivanje subklinički invadiranih pasa, ali i eliminaciju nespecifičnih reaktora. Na području Zadarske županije, koja je dosad smatrana područjem slobodnim od enzootske lišmanioze pasa, detektirani su pozitivni psi. Neočekivano veliki broj žarišta i visoka seroprevalencija od 27,9 %, ustanovljena je na području Knina u Šibensko-kninskoj županiji. Niža seroprevalencija od očekivane utvrđena je Splitsko-dalmatinskoj županiji, koja je poznato enzootsko područje.

Jedna od najvažnijih mjer suzbijanja lišmanioze u Republici Hrvatskoj trebalo bi biti sustavno praćenje, tijekom kojeg bi se primjenom optimalnog dijagnostičkog protokola, postiglo preliminarno otkrivanje subklinički invadiranih pasa u enzootskom i graničnom području. U prvoj fazi trijaže bi trebalo pse pretražiti primjenom visoko osjetljivih metoda kao što su imunoenzimni test (ELISA) i kDNA PCR. Lažne pozitivne reaktore bi se eliminiralo u drugoj fazi, upotrebom seroloških metoda visoke specifičnosti poput IFAT testa ili Leishmania Dipstick rK39 brzog imunokromatografskog testa, te molekularnom metodom ugniježđena (*nested*) PCR.

Ključne riječi: lišmanioza, pas, enzootsko područje, PCR, seroprevalencija

SUMMARY

MONITORING OF CANINE LEISHMANIOSIS USING DIFFERENT COMBINATIONS OF DIAGNOSTIC METHODS

The purpose of this study was to examine blood samples of apparently healthy dogs. Some of these dogs lived in known hot spots in enzootic areas, some outside of these hot spots, and some in the border areas. We would like to get qualitative insight into prevalence of leishmaniosis by using molecular and serological diagnostic tests. The aim was also to explore the possibilities of combinations among diagnostic methods with various accuracy and precision and standardization of protocols.

Methods:

A total of 242 blood samples were collected from clinically healthy dogs of various breeds and categories, from three Dalmatian counties. The blood samples were tested for CanL by using four serological and three molecular biology tests. Used serological tests were: ELISA (ELISA-INGENASA), IFAT (modified *in house* method), commercial rapid ELISA test (SNAP® CLATK IDEXX) and immunochromatographic strip test, Leishmania Dipstick RAPYDTEST ® DyaSys.

To detect the DNA of *L. infantum*, we used three different protocols: kDNA (LE FICHOUX i sur., 1999), Internal transcribed spacer 1 (SCHÖNIAN i sur., 2003) and nested PCR (FISA i sur., 2001).

Results:

Thirty four (prevalence 14%) dogs reacted positive with at least one of the 7 applied serological or molecular tests. At least one serological test was positive in 30, one molecular in 21, and one serological and molecular test simultaneously in 17 dogs.

In Zadar County, which was regarded as an area free of enzootic CanL, we also detected positive dogs. An unexpectedly large number of hot spots and high seroprevalence of 27.9% was found in Knin area (Sibenik-Knin County). Lower-than-expected seroprevalence was determined in Split-Dalmatia County, which is known enzootic area.

Discussion:

The prevalence of leishmaniosis in canine population is an important epidemiological factor on which depends directly the extent of the disease in humans. Studies simultaneously comparing the sensitivity of serological and molecular methods are scarce, usually carried out

in small groups of experimentally infected dogs or within a small population, with single serological and molecular method applied. Reliable estimation of the disease burden depends primarily on the credibility of the methods for infected dogs identification. In Croatia it is necessary to conduct monitoring, in addition to other control measures for leishmaniosis. It is important to establish optimal diagnostic protocols to detect subclinically infected dogs, which are the reservoirs of the pathogen for the vectors. CanL, as a disease, has a high incidence of dogs in presymptomatic phase, therefore monitoring is necessary. Presymptomatic phase (incubation) of leishmaniosis is usually very long, therefore it is very likely that the use of multiple screening will discover a significant number of infected dogs. The monitoring program should include testing of a certain portion of the population of apparently healthy dogs by using combination of serological and molecular tests which meet certain criteria in terms of sensitivity and specificity (i.e. accuracy and precision).

Therefore, the dogs which are evaluated would be correctly classified. Based on the results of our study we have demonstrated that appropriate tests are: ELISA test, IFAT, immunochromatographics strip quick test rK39, and kDNA PCR and nested PCR.

Conclusion:

We conducted the first surveillance which simultaneously evaluates and compares the sensitivity of four serological and three molecular methods within the exposed population (dogs in enzootic areas). Single method used (serological or molecular) or the change of the order of multiple methods may provide erroneous (false positive or false negative) results of incidence and prevalence of canine leishmaniosis in enzootic and border areas. Increasing number of dogs in cohort does not increase the likelihood of hot spots. Transmission of parasite via direct contact is questionable and there is no evidence of its epizootiological significance. Diagnostic methods which implied single serological method (mainly carried out in the enzootic area of Dalmatia) definitely have been unable to detect many of the infected dogs. On the basis of the obtained results within enzootic area, obvious is necessity for several monitoring methods in specified, predetermined order, which was demonstrated for the first time in the study providing scientific originality.

Spread out of the CanL, based on our results, can not be measured objectively because similar studies have not been conducted.

Key words: leishmaniosis, dog, enzootic area, PCR, seroprevalence

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	2
2.1. Definicija	2
2.2. Povijesni podaci	2
2.2.1. Kožni oblik bolesti na istočnoj zemljinoj polutki	2
2.2.2. Visceralni oblik bolesti na istočnoj zemljinoj polutki	3
2.2.3. Kožni oblik bolesti na zapadnoj zemljinoj polutki	3
2.2.4. Visceralni oblik bolesti na zapadnoj zemljinoj polutki	4
2.3. Uzročnik	4
2.4. Klasifikacija lišmanija	5
2.5. Morfologija i biologija vektora	5
2.5.1. Morfologija	6
2.5.2. Biologija	6
2.5.2.1. Juvenilni stadiji	6
2.5.2.2. Adulti	6
2.6. Razvoj lišmanija u biološkom vektoru	7
2.7. Interakcija s nosiocem	8
2.8. Rezervoari	9
2.8.1. Psi kao rezervoari <i>L.infantum</i>	10
2.9. Odnos nosioca, parazita i posrednika	10
2.10. Lišmanioza u ljudi	10
2.10.1. Oblici bolesti u ljudi	11
2.10.1.1. Kožna lišmanioza	11
2.10.1.2. Difuzna kožna lišmanioza	11
2.10.1.3. Kožno-služnička lišmanioza	12
2.10.1.4. Visceralna lišmanioza	12
2.11. Lišmanioza kod pasa	13
2.11.1. Epizootiologija	13
2.11.2. Lišmanioza pasa u neenzootskim područjima	14
2.12. Prijenos lišmanija među psima bez prisustva biološkog vektora	14
2.13. Lišmanioza u Hrvatskoj	14
2.13.1. Epidemiološki podaci o lišmaniozi ljudi u Hrvatskoj	15
2.13.2. Povijesni i epizootiološki podatci o lišmaniozi pasa u Hrvatskoj	15

2.13.3. Populacija vektora u Dalmaciji	16
2.14. Patogeneza	16
2.15. Klinička slika kod pasa	17
2.15.1. Stupnjevi kliničke bolesti	19
2.16. Razudbeni nalaz	20
2.16.1. Makroskopske promjene	20
2.16.2. Mikroskopske lezije	20
2.17. Prevalencija bolesti, seroprevalencija i prevalencija invazije u enzootskim područjima	21
2.18. Uloga tipa imunosnog odgovora u razvoju kliničke slike	23
2.19. Dijagnostika	23
2.19.1. Klinička dijagnostika	23
2.19.2. Laboratorijska dijagnostika	24
2.19.2.1. Direktne metode dijagnostike	24
2.19.2.1.1. Parazitološka dijagnostika	24
2.19.2.1.1.1. Mikroskopska pretraga	25
2.19.2.1.1.2. Izdvajanje i uzgoj uzročnika <i>in vitro</i>	25
2.19.2.1.1.3. Biološki pokus	25
2.19.2.1.2. Molekularne metode	25
2.19.2.1.3. Primjena PCR u klinički zdravih pasa	26
2.19.2.2. Indirektne metode dijagnostike	27
2.19.2.2.1. Serološke metode (detekcija specifičnih protutijela)	27
2.19.2.2.1.1. Neizravna imunofluorescencija	27
2.19.2.2.1.2. Imunoenzimni test (ELISA)	27
2.19.2.2.1.3. Ostali serološki testovi	28
2.19.2.2.1.4. Ograničenja seroloških metoda	28
2.20. Liječenje	29
2.21. Primjena seroloških pretraga u kontroli učinkovitosti liječenja	29
2.22. Prognoza	30
2.23. Kliničko praćenje	30
2.24. Pretraživanje klinički zdravih pasa na prisutnost lišmanejske DNK	32
3. OBRAZLOŽENJE TEME	33
4. MATERIJAL I METODE	34
4.1. Zemljopisni podaci	34
4.2. Psi	35

4.2.1. Distribucija pasa prema kategorijama (namjeni)	36
4.2.2. Distribucija pasa prema dobnim skupinama	37
4.3. Klinička pretraga	38
4.4. Uzimanje uzoraka	38
4.5. Primjenjene serološke metode	38
4.5.1. Neizravna imunofluorescencija	39
4.5.2. Imunoenzimni test (ELISA)	41
4.5.3. Canine Leishmania Antibody Test Kit (SNAP IDEXX)	43
4.5.4. Leishmania Dipstick Rapydtest DyaSys	44
4.6. Molekularne metode	46
4.6.1. Izolacija DNK iz krvi	46
4.6.2. Lančane reakcije polimerazom	46
4.6.2.1. Kinetoplastna DNK	47
4.6.2.2. Unutarnja prepisujuća razmaknica	47
4.6.2.3. Ponavljamajuće sekvence DNK	48
4.7. Statistička analiza	49
5. REZULTATI	50
5.1. Rezultati obavljenih pretraga po županijama i mjestima	50
5.1.1. Zadarska županija	52
5.1.2. Šibensko-kninska županija	54
5.1.3. Splitsko-dalmatinska županija	56
5.1.4. Zbirni rezultati po županijama	58
5.2. Rezultati prema broju pasa u dvorištima	58
5.2.1. Udio seropozitivnih pasa u pozitivnim dvorištima	62
5.2.1.1. Zadarska županija – dvorišta sa seropozitivnim psima	62
5.2.1.2. Šibensko-kninska županija – Dvorišta sa seropozitivnim psima	63
5.2.1.3. Splitsko-dalmatinska županija – Dvorišta sa seropozitivnim psima	64
5.2.2. Dvorišta sa psima pozitivnim molekularnim (PCR) metodama	65
5.2.2.1. Zadarska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) metoda	66
5.2.2.2. Šibensko-kninska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) metoda	67
5.2.2.3. Splitsko-dalmatinska županija - Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) metoda	68
5.2.3. PCR i serološki pozitivna dvorišta	68
5.2.3.1. Zadarska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) i seroloških metoda te ukupan broj pasa u pozitivnim dvorištima	69

5.2.3.2. Šibensko-kninska županija - Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) i seroloških metoda te ukupan broj pasa u pozitivnim dvorištima	70
5.2.3.3. Splitsko-dalmatinska županija - Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) i seroloških metoda te ukupan broj pasa u pozitivnim dvorištima	71
5.3. Rezultati pretraga prema kategorijama pasa	72
5.4. Rezultati pretraga prema spolu pasa	72
5.5. Rezultati pretraga prema dobnim skupinama pasa	73
5.6. Pozitivni uzorci prema primijenjenim metodama	74
5.7. Statističke razlike	77
6. RASPRAVA	85
6.1. Područje pretraživanja i uzorci	86
6.2. Međusobni odnos serološki i molekularno pozitivnih uzoraka	87
6.3. Pregled rezultata po županijama	88
6.4. Pregled rezultata prema broju pasa u dvorištima	89
6.5. Rezultati primijenjenih seroloških i molekularnih metoda	90
6.6. Odabir dijagnostičkih metoda za provođenje praćenja	93
6.7. Mjere koje bi trebalo poduzeti u svrhu kontrole lišmanioze pasa	95
7. ZAKLJUČCI	97
8. POPIS LITERATURE	98
9. PRILOZI	120
10. ŽIVOTOPIS	122

1. UVOD

Bolesti koje prenose člankonošci-vektori u pasa (*Canine Vector Borne Diseases – CVBD*) čine jedno od najzanimljivijih i najsloženijih poglavlja veterinarske medicine. One su iznimno važne i zbog zoonotskoga potencijala nekih od tih bolesti.

Do prijenosa patogena dolazi tijekom uzimanja krvnog obroka, kad invadirani ili inficirani člankonožac u organizam nosioca inokulira mikroorganizme ili parazite.

Makroklimatske i mikroklimatske promjene koje su uslijedile posljednjih desetljeća, prilagodba nosioca i biološkog vektora izmijenjenim uvjetima okoliša, te uloga psa u visoko industrijaliziranim zemljama (od suputnika na putovanjima do osobnog asistenta) i sve jednostavnije i češće migracije ljudi i životinja, samo su neki od čimbenika porasta učestalosti takvih bolesti.

Detekcija klinički i subklinički invadiranih/inficiranih jedinki, suzbijanje vektora i onemogućavanje interakcije između vektora i nosioca su ključni elementi u suzbijanju bolesti koje prenose vektori.

Visceralu lišmaniozu ljudi i lišmaniozu kod pasa u Europi uzrokuje isti parazit – protist *Leishmania infantum*. Pas je prirodni rezervoar *L. infantum*, pa je stoga i glavni cilj mnogih programa kontrole bolesti.

Uzročnika prenose hematofagni insekti – papatači iz podroda *Larroussius*, rod *Phlebotomus*. Sredozemni bazen je enzootsko područje lišmanioze pasa (MENCKE i sur., 2013.).

Dok u neenzootskim područjima invazija *L. infantum* obično uzrokuje teške kliničke oblike bolesti (MAROLI i sur., 2008.), u enzootskim područjima kod mnogih invadiranih pasa razvoj kliničkih simptoma može i izostati (OTRANTO i sur., 2009.).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Definicija

Pojam lišmanioze obuhvaća skupinu kroničnih protozojskih bolesti ljudi i brojnih vrsta toplokrvnih životinja, a uzročnici su različite vrste heteroksenih parazita monocitno - makrofagnog sustava iz roda *Leishmania*. Te bolesti variraju u svojoj kliničkoj manifestaciji od promjena na koži koje prolaze bez liječenja, pa do teških oblika praćenih opsežnim oštećenjima tkiva i organa koja u konačnici dovode do smrti.

Pored čovjeka, od lišmanioze može oboljeti veliki broj sisavaca. Osim pasa, lisica, šakala, servala te glodavaca (MARQUARDT, 2000.) spominju se i mačke (LAURELLE-MAGALON i TOGA, 1996., OZON i sur., 1998., POLI i sur., 2002.), te konji (KOEHLER i sur., 2002.).

2.2. Povijesni podaci

2.2.1. Kožni oblik bolesti na istočnoj zemljinoj polutki

Događaji opisani u Starom zavjetu, knjiga Izlaska (Exodus 9 i 10) o kazni u obliku čireva na koži („Nile pimple“) koju je Jahve preko Mojsija bacio na Egipćane, prema nekim današnjim tumačenjima bili su pojava lišmanioze (OUMEISH, 1999.).

Bolest je bila poznata u gradu Balkh, provincija Khorrasan, na sjeveru današnjeg Afganistana, još 970. godine. Avicena je opisivao „Balkh sore“, dok ju je lokalno stanovništvo nazivalo „Pasha Gazidagi“ što znači ubod komarca. Pretpostavlja se da se bolest iz pokrajine Khorrasan i Irana proširila do Bagdada migracijama osvajačkih vojnih trupa.

Prvi i najvažniji klinički opis bolesti na engleskom jeziku, iz 1756, djelo je Alexandra Russella. Russell je navodio grad Aleppo (Sirija) kao endemijsko područje. Bolest se tada uobičajeno nazivala „Aleppo boil“, a Europljani su je nazivali i „Aleppo Evil“ (OUMEISH, 1999.). 1885. je Cunningham (Indija) opisao uzročnika „Delhi boil“ iz histološkog reza i zaključio da se radi o gljivici.

Vojni kirurg Borowsky na službi u Tashkhentu (Uzbekistan) opisao je ulceracije u 20 pacijenata, nazivajući ih „Sartor ulcer“ i 1898. je opisao uzročnika, zaključio je da se radi o protozoonu, ali nažalost ga nije imenovao. (OUMEISH, 1999.).

2.2.2. Visceralni oblik bolesti na istočnoj zemljinoj polutki

U Starom svijetu, indijski liječnici su poznavali tešku bolest sanskrtskoga naziva kala-azar, što u prijevodu znači crna groznica. Godine 1901, major britanske vojske, dr. William Leishman u razmasku tkiva slezene engleskog vojnika koji je tijekom službe u Bengaliju, Indija, obolio i umro od „Dum-Dum groznice“, uočio je ogroman broj ovalnih tjelešaca promjera 2-3 µm. Bolest je karakterizirala opća iznurenost, učestali napadi groznice u nepravilnim intervalima, teška anemija, atrofija mišića i enormno povećanje slezene. Tada se smatralo da su otkriveni uzročnici tripanosome.

James Donovan, vojni liječnik u Madrasu je 1903. godine opisao sličan nalaz u razmasku tkiva enormno povećane slezene Indijca umrlog od kako se tada mislilo – malarije. Povezanost novo otkrivenih organizama i bolesti poznate kao “kala azar” konačno je otkrio Ronald Ross, tadašnji urednik British Medical Journal, koji je uzročnika nazvao Leishman Donovan body. Sergent je 1905. objavio sumnju da je vektor *Phlebotomus* sp.

Charles Nicolle 1908. g. otkriva da i drugi sisavci, posebno psi, također mogu oboljeti od iste bolesti. Prvi uspijeva uzgojiti uzročnika na krvnom agaru i modificiranom Nicolle, Novy and McNeal mediju (NNN) (OUMEISH, 1999.).

2.2.3. Kožni oblik bolesti na zapadnoj zemljinoj polutki

U Novom svijetu (Južna Amerika), je kod ljudi kožni oblik lišmanioze prisutan od pretkolumbovog doba. Prikazi kožnih promjena i deformacija lica pronađeni su na lončarijama iz doba prije Inka u Peruu i Ekvadoru i potječu iz 1. stoljeća n.e.

Zapisi iz vremena Inka u 15. i 16. stoljeću i tijekom španjolske kolonizacije, opisuju sezonsku pojavu bolesti u poljodjelaca pristiglih iz Anda. Imali su ulceracije po koži, a bolest se nazivala „Bolest doline“ ili „Bolest Anda“. Nastale deformacije nosa i usta nazivane su i „Bijela guba“ jer su podsjećale na lezije u gubavaca (OUMEISH, 1999.).

Prvi zapis o kožnoj lišmaniozi u južnoj Americi djelo je Lindberga iz 1909. godine. Vianna, 1911. g. pripisuje bolest novoj vrsti lišmanija koju naziva *Leishmania braziliensis*.

Bates, 1913. g. opisuje prvi slučaj kožno-sluzničkog oblika bolesti. Adler i Theodor 1925. g. identificiraju insekta – vektora (OUMEISH, 1999.).

2.2.4. Visceralni oblik bolesti na zapadnoj zemljinoj polutki

Budući da nema podataka o visceralnoj lišmaniozi na području Latinske Amerike prije prvog parazitološki dokazanog slučaja u Paragvaju tijekom 1913. godine, prepostavljeno je da je uzročnik donesen iz Sredozemlja u vrijeme osvajanja Novog svijeta, gdje je zatekao prikladne posrednike i rezervoare (LAINSON, 1982.).

Novijim opsežnim istraživanjima uzročnika provedenim primjenom visoko varijabilnih mikrosatelitskih markera utvrđene su neznatne genetske razlike između sojeva *L. infantum* Novog i Starog svijeta. Autori su dokazali da je *L. infantum* iz jugozapadne Europe, višekratno unošena na američki kontinent, te da su *L. infantum* i *L. chagasi* sinonimi jedinstvenog uzročnika (KUHLS i sur., 2011.).

2.3. Uzročnik

Pripadnici roda *Leishmania*, zajedno s parazitskim bičašima iz rodoa *Trypanosoma*, *Trichomonas* i *Giardia*, spadaju u razred Zoomastigophora, koljena Sarcomastigophora, carstva Protista. Rod *Leishmania* dijeli se u dva podroda, (*Leishmania* i *Viannia*), a osnovni kriterij je mjesto diobe promastigota u probavnom traktu insekta - posrednika (KILLICK-KENDRICK, 2002.). Opisano je tridesetak vrsta i podvrsta iz roda *Leishmania*, a dvadesetak ih uzrokuje bolest u ljudi (ASHFORD, 2000.).

Lišmanije su heterokseni, obligatni, intracelularni, jednostanični paraziti stanica monocitno makrofagnog sustava. Spadaju u skupinu bičaša, a za cijelu porodicu karakteristično je da se razvijaju preko posrednika, a parazit poprima različite oblike u nositelju, kralježnjaku (glodavci, kanidi i ljudi) i insektu - posredniku (vektor). U crijevu posrednika i pri laboratorijskom uzgoju lišmanija na hranjivim podlogama, nalazimo veći, promastigotni – ekstracelularni oblik, veličine do 20 µm, s bićem na prednjem kraju.

Amastigote, razvojni oblik vezan isključivo za stanicu (intracelularni oblik), nalazimo kao okruglastu unutar staničnu tvorbu, veličine 2-5 µm u makrofagima kralježnjaka, gdje vrlo uspješno prezivljavaju i dijele se dvojnom diobom. Nakon pucanja napadnute stanice, u nove makrofage ulaze tako što budu fagocitirani. U razmazu obojenom po Giemsi uočava se crvena jezgra i crveno-ljubičasti kinetoplast (SCHMIDT I ROBERTS, 1985.). Običnim svjetlosnim mikroskopom amastigote možemo vidjeti imerzijskim objektivom (povećanje 1000-1200 x). Amastigoti u tkivima kralježnjaka su međusobno vrlo slični, pa je nemoguće međusobno razlikovati vrste.

Prilikom uzimanja krvnog obroka insekt - posrednik unosi u svoj probavni trakt i amastigote koji se tamo umnožavaju i prolaze nekoliko stupnjeva preobrazbe, što rezultira tvorbom izduljenog, tzv. promastigotnog oblika koji ima bič.

Promastigote u kožu novog nosioca insekt - posrednik inokulira prilikom sljedećeg hranjenja. Nakon ulaska u kožu nosioca, promastigoti gube bič, zaokružuju se i transformiraju u amastigotni oblik.

2.4. Klasifikacija lišmanija

Zbog nemogućnosti morfološke identifikacije lišmanije se obično klasificira s obzirom na klinički oblik bolesti koji izazivaju kod ljudi (visceralna, kožna i kožno-sluznička), na zemljopisnu lokaciju gdje se bolest javlja (lišmanioze Starog i Novog svijeta), te s obzirom na postojanje (zoofilne) ili odsustvo (antropofilne) animalnog rezervoara. Posljednjih dvadesetak godina izolate se klasificira na osnovi njihovih biokemijskih i molekularnih osobina. Trenutačno se analiza izoenzima elektroforezom i taksonomsко grupiranje određenih grupa, tzv. zimodema, još uvek smatra referentnom metodom za identifikaciju lišmanija (SCHALLIG i OSKAM, 2002.). Različite vrste lišmanija koje dijele neke zajedničke karakteristike su grupirane u tzv. komplekse (SLAPPENDEL i FERRER, 1998.).

2.5. Morfologija i biologija vektora

Svim vrstama iz roda *Leishmania* biološki vektori su sitni hematofagni insekti reda Diptera (dvokrilci), podreda Nematocera (dugoticalci), porodice Psychodidae i potporodice Phlebotominae, rod *Phlebotomus* (Stari svijet) odnosno rod *Lutzomyia* (Novi svijet) (KILLICK-KENDRICK, 1999.).

Kod nas su poznati kao papatači, nevidi, mošunci i čami. Postoji preko 700 vrsta flebotomina od kojih se 70 smatra biološkim vektorima raznih bolesti. Krvlju se hrane samo ženke.

Papatači prvenstveno nastanjuju tropska i suptropska područja od približno 50° sjeverno do 40° južno od ekvatora (MARQUARD i sur. 2000.).

2.5.1. Morfologija

Papatači su sitni dvokrilci, bijele do gotovo crne boje (KILLICK-KENDRICK, 1999.). Duljina tijela im rijetko prelazi 3 mm. Obrasli su mnogobrojnim finim dlačicama, a u mirovanju krila drže podignuta iznad abdomena pod kutom od oko 60°. Glava im je izduženog oblika, a usni aparat prilagođen je za ubadanje i sisanje. Abdomen se sastoji od 10 članaka, a zadnja 2 predstavljaju vanjske spolne organe. Determiniraju se na osnovu morfoloških karakteristika: palpa, antena, građi faringealne šupljine, vanjskih spolnih organa mužjaka i spermateka u ženki (KILLICK-KENDRICK, 1999.).

2.5.2. Biologija

2.5.2.1. Juvenilni stadiji

Juvenilni stadiji razvoja uključuju jajašca, četiri stadija ličinke i kukuljicu. Razvoj se odvija u vlažnom tlu bogatom organskom tvari, na mjestima zaštićenim od kiše i izravne sunčeve svjetlosti. Ličinke se nakon izlaska iz jajašca razvijaju 2-10 tjedana, a kukuljice završavaju razvoj za desetak dana (SCHMIDT i ROBERTS, 1985.). Papatači prezimljavaju u stadiju ličinke četvrtog stupnja. Preživljavanje lišmanija tijekom zime se odvija u invadiranim psima jer kod papatača nije dokazan transovarijalni prijenos lišmanija (BATES, 2007.).

2.5.2.2. Adulti

Adulti se pojavljuju u proljeće i žive do jeseni. Aktivni su od sumraka do zore (KILLICK-KENDRICK, 1999.), dok općenito najviše ubadaju neposredno nakon zalaska sunca i to uglavnom na otvorenim prostorima a rjeđe u nastambama. Mužjaci i ženke hrane se slatkim sekretima biljaka i medljikom, a samo ženke papatača sišu krv toplokrvnim životinjama i koriste je za produkciju jajašaca (KILLICK-KENDRICK, 1999.).

Raspon temperatura pri kojima su aktivni je 15-28°C i uvijek je povezan s visokom relativnom vlažnosti zraka i izostankom kiše i vjetra. U letu se kreću karakterističnim kratkim skokovima i za razliku od komaraca tijekom napada su nečujni (KILLICK-KENDRICK, 1999.). Tijekom dana traže hladna i vlažna mjesta za odmor, kao što su podrumi, staje, jazbine glodavaca i drugih sisavaca, ptičja gnijezda, pukotine u zidovima, drveću, kamenju i tlu.

Obično se kreću u radijusu od samo nekoliko desetaka metara od mjesta gdje su se izlegli, na visini do tri metra iznad zemlje (KAFETZIS, 2003.), iako ih vjetar može odnijeti više desetaka, pa i stotina metara (MARQUARDT i sur., 2000.).

Kad ženka papatača radi hranjenja sleti na kožu životinje, kreće se preko dlake karakterističnim skokovima i traži mjesto za ubadanje. Papatači ubadaju psa pretežno na mesta slabo obrasla dlakom kao što su glava, nosni hrbat, uške te ingvinalno i perianalno područje (KILLICK-KENDRICK, 1999.). Tijekom hranjenja ženka papatača slinom inokulira nosiocu veliki broj aktivnih tvari čija je primarna uloga prevencija hemostaze, ali imaju i imunosupresivno djelovanje (KAMHAWI, 2000.).

Parenje se obavlja neposredno nakon što ženke uzmu krvni obrok, jer nenahranjene ženke ne produciraju jajašca (KILLICK-KENDRICK, 1999.).

2.6. Razvoj lišmanija u biološkom vektoru

Određene vrste papatača su biološki vektori samo određenim vrstama lišmanija, što je izravno povezano s prilagodbom parazita na uvjete u crijevu određene vrste insekata (HANDMAN, 2000.). Prirodni se prijenos uzročnika događa samo u područjima gdje je prisutna vrsta koja je kompetentan posrednik (KILLICK-KENDRICK, 1999., VOLF i sur., 2008.).

Kada papatač uzme krvni obrok s invadiranog nosioca, unese u svoj probavni trakt i makrofage amastigotima. Krvni obrok biva zadržan unutar tzv. peritrofične membrane koja je produkt epitelnih stanica srednjeg crijeva (KILLICK-KENDRICK, 1990.; cit. HANDMAN, 2000.). Metabolički procesi u novoj sredini potječu pretvorbu amastigota prvo u tzv. procikličke (ili crijevne) promastigote, a nakon toga u metacikličke ili invazijske promastigote (VICKERMAN i PRESTON, 1976., SACKS, 1988.; cit. HANDMAN, 2000.). Prociklički promastigoti dugi su 6-8 µm, brzo se dijele i nakon nekoliko dana migriraju prema prednjem dijelu crijeva (SCHLEIN, 1993.; cit. HANDMAN, 2000.). Prociklički promastigoti nastavljaju se dijeliti. Bičem se prihvataju za resice crijeva, te se na taj način fiksiraju i sprječavaju da budu izbačeni peristaltikom (WALTERS i sur., 1987.; cit. HANDMAN, 2000.). Daljnja diferencijacija i dozrijevanje promastigota završava za 5-8 dana; metaciklički promastigoti se prestaju dijeliti, izduljeni su i vrlo pokretni. Dugi su 15-20 µm, imaju jezgru, kinetoplast i dugi bič i spremni su invadirati nositelja. Crijevo papatača zapriječeno je želatinoznom masom sastavljenom od promastigota i proteofosfoglikana koje su proizveli (HANDMAN, 2000.). Metaciklički promastigoti lako se kreću kroz tu masu (SCHLEIN, 1993.; cit. HANDMAN, 2000.) i pri svakom pokušaju hranjenja papatača, u nosioca biva

inokulirano 10-100 metacikličnih promastigota (WARBURG i SCHLEIN, 1986.; cit. HANDMAN, 2000.).

2.7. Interakcija s nosiocem

Lišmanije se primarno umnažaju u makrofagima kože na mjestu inokulacije. Ukoliko nosilac ne uspije razviti učinkovit imunosni odgovor dolazi do širenja uzročnika putem mononuklearnih fagocita iz kože u limfne čvorove, koštanu srž, slezenu i jetru i razvoja kronične i često smrtonosne bolesti (STRAUSS-AYALI i BANETH, 2000.).

Prva zapreka koju inokulirani promastigoti moraju izbjegći jest litičko djelovanje aktiviranog serumskog komplementa. To uspijevaju pomoću membranske proteaze (tzv. lišmanolizin) koja cijepa C3 sastavnicu komplementa u oblik koji se ne može vezati na površinu lišmanejske stanice (BRITTINGHAM i MOSSER, 1996.; cit. HANDMAN, 2000.). Posljedica hidrolize C3 je kemotaksija nekih peptida, što privlači monocite u to područje (MURRAY, 1994.; cit. HANDMAN, 2000.). Lišmanija ne ulazi aktivno u makrofage već bude fagocitirana te se formira fagolizosom ili tzv. parazitoftorna vakuola, bogata hidrolitičkim enzimima i mikrobicidnim peptidima (ANTOINE i sur., 1998.; cit. HANDMAN, 2000.). Tijekom prijenosa s papatača na sisavca, promastigoti se susreću s mnogim promjenama u okolišu. Naročito je važan porast temperature na 35-37° C, te pad pH na oko 5. Zbog toga počinje proces tijekom kojeg gube bič i znatno se smanjuju do promjera 2-4 µm (HANDMAN, 2000.).

Membranski proteini amastigota otporni su na proteolizu i nizak pH, a invadirani makrofagi ne gube u potpunosti mikrobicidnu funkciju, iako im je spriječena proizvodnja kisikovih radikala (O_2) i vodikovog peroksida (H_2O_2), kao najvažnijih čimbenika mikrobicidnog učinka (MURRAY, 1986.; cit. HANDMAN, 2000). Pored toga, lišmanije sintetiziraju skupinu spojeva male molekularne težine, tzv. glikozil-inozitol fosfolipide (GIPL) koji mogu spriječiti sintezu dušikovog monoksida (NO) i umanjiti lišmanicidnu aktivnost aktiviranih makrofaga (MAUËL, 1996.).

Tijekom visceralne i difuzne kožne lišmanioze, koje karakterizira umnažanje i diseminacija parazita, dokazano je odsustvo imunosne reakcije s proizvodnjom citokina tipa 1. IL-10 je najvažniji citokin koji inhibira imunosni odgovor, tako što inhibira sintezu IL-12, IL-2, TNF- α i IFN- γ . U nekim slučajevima dokazano je da neki rekombinantni antigeni lišmanejskih promastigota potiču makrofage i limfocite na proizvodnju IL-10 te time moduliraju imunosnu reakciju (CARVALHO i sur., 2003.). Najvažnija posljedica je supresija staničnog imunosnog

odgovora, odnosno izostanak proliferacije limfocita u cirkulaciji, izostanak proizvodnje citokina kao što su IFN- γ i TNF- α , koji su neophodni za aktiviranje makrofaga i uništavanje intracelularnih parazita (PINELLI i sur., 1999.).

Proizvodnja citokina ključnih za uspostavljanje stanične obrane, kod ljudi se obično događa nakon, odnosno tijekom liječenja, kad makrofagi koji su „domaćini“ amastigotima, postanu konačni „egzekutori“, te kad ih i T-limfociti prepoznaju kao stanice koje prikazuju antigen. Izuzetak su pacijenti s nekim nedostatkom stanične obrane, odnosno T-limfocita, kod kojih prije ili kasnije, po prestanku liječenja, dolazi do vraćanja simptoma bolesti (MURRAY, 2001.).

2.8. Rezervoari

Pojam „rezervoar“ označava nosioca čija svojstva pogoduju održavanju i širenju određenog uzročnika bolesti (DANTAS-TORRES, 2007.).

Primarni rezervoari lišmanija su divlji sisavci, najčešće šumski glodavci i divlji kanidi (DANTAS-TORRES, 2007.). S približavanjem zoonotskoga cikusa prijenosa lišmanija čovjekovom okruženju, uloga rezervoara sve više pripada domaćim životinjama i vrstama koje su s čovjekom u sinantropnom odnosu (DANTAS-TORRES, 2007.).

Mogućnost da se uzročnik održi u bilo kojoj populaciji primljivog nosioca ovisi o brojnim čimbenicima. Najvažniji su; broj jedinki na jedinici površine, odnosno gustoća naseljenosti, životni vijek nosioca, smještaj parazita u nosiocu, te razvoj imunosti. Da bi se moglo govoriti o rezervoaru bolesti sve ove pretpostavke za parazita trebaju biti optimalne (ASHFORD, 2000.).

Kod zoofilnih lišmanioza, rezervoar su životinje, a čovjek je „slijepa ulica“ (LAINSON, 1982., DEREURE i sur., 1999., HANDMAN, 2001., RAMOS-E-SILVA i DE MOURA CASTRO, 2002.). Samo su dvije vrste lišmanija isključivo antropofilne (rezervoar je čovjek, a ne životinja) i posrednik prenosi uzročnika s čovjeka na čovjeka: uzročnik kožne lišmanioze *Leishmania tropica* i uzročnik visceralne lišmanioze *Leishmania donovani* (GREVELINK i LERNER, 1996.; cit. GIAMARELOU, 2000.).

2.8.1. Psi kao rezervoari *L.infantum*

Kanidi općenito su pogodan rezervoar *L. infantum*. Psi su zbog bliskog kontakta s ljudima posebno značajan prirodni rezervoar, jer su uz izuzetak nekih pasmina (Ibički gonič) (SOLANO-GALLEGO i sur., 2000.), vrlo prijemčivi na invaziju *L. infantum*. (MORENO i ALVAR, 2002.). Pored toga, u područjima gdje je zoonotska visceralna lišmanioza endemijska bolest, redovito je i prevalencija lišmanioze u pasa visoka, s visokim udjelom asimptomatski invadiranih (DANTAS-TORRES i sur., 2006.). Psi k tome mogu imati veliki broj amastigota u koži što povećava mogućnost prijenosa (ASHFORD, 1996., DANTAS-TORRES i BRANDÃO-FILHO, 2006.). Konačno, pas može ostati invadiran *L. infantum* bez razvoja vidljivih kliničkih znakova bolesti, godinama pa i cijeli život (MORENO i ALVAR, 2002.).

Zimodema MON-1 *L. infantum* je uzročnik većine slučajeva visceralne lišmanioze kod ljudi u području Sredozemlja, i također je najčešće izoliran iz pasa (PRATLONG i sur., 2004.).

2.9. Odnos nosioca, parazita i vektora

Za egzistiranje i širenje bolesti na nekom području, ključno je da u neposrednoj blizini žive rezervoar i kompetentan posrednik s navikama hranjenja na rezervoaru (KILLICK-KENDRICK, 1999.). U područjima gdje su u međusobnom skladu navike i potrebe rezervoara, vektora i parazita formiraju se tzv. žarišta (ASHFORD, 2000.).

2.10. Lišmanioza u ljudi

Lišmanioza je skupina većinom zoonotskih nametničkih bolesti od kojih boluje oko 14 milijuna ljudi u 88 zemalja a uzrokuje ih tridesetak vrsta iz roda *Leishmania* (ALVAR i sur. 2004.). Bolest je endemijska na pet kontinenata i ugrožava više od 350 milijuna ljudi. Incidencija se procjenjuje na 2 milijuna novih slučajeva bolesti svake godine, od čega 500 000 slučajeva otpada na visceralni a 1 500 000 na kožni oblik bolesti (DESJEUX, 2004.).

Od posljedica visceralne lišmanioze godišnje umire oko 59 000 ljudi, i od nametničkih bolesti jedino je malarija smrtonosnija (DESJEUX, 2004.). Karakteristika lišmanioze jest da je jedna od najvažnijih parazitoza koja pogađa siromašne slojeve stanovništva u suburbanim i ruralnim područjima diljem svijeta (ALVAR i sur., 2006.).

2.10.1. Oblici bolesti u ljudi

Lišmanioza u ljudi javlja se u barem četiri osnovna oblika: kožni, difuzni kožni, kožno-sluznički i visceralni (DESJEUX, 2004.). Osim o vrsti uzročnika, oblik bolesti ovisi i o imunološkom statusu pacijenta (ASHFORD, 2000.).

2.10.1.1. Kožna lišmanioza

Većina vrsta lišmanija u ljudi uzrokuje kožni oblik bolesti (CL). Kožni oblik na područjima Novog svijeta (Južna Amerika) uzrokuju vrste iz podroda *Viannia* i sve vrste iz kompleksa *L. mexicana*.

U zemljama Starog svijeta uzročnici ovog oblika bolesti su vrste iz kompleksa *L. tropica*; *L. tropica*, *L. major* i *L. aethiopica*. S izuzetkom antroponotske vrste *L. tropica*, sve ostale navedene vrste su zoonotske. Općenito, kožni oblik može biti rezultat invazije bilo kojom vrstom lišmanija koje napadaju čovjeka (MURRAY i sur., 2005.).

Klinički se očituje u obliku kožnih ulcera nastalih na mjestu uboda invadiranog papatača, koji u pravilu spontano zacjeljuju, ali relativno često ostavljaju trajne deformacije (BAÑULS i sur., 2007.).

2.10.1.2. Difuzna kožna lišmanioza

Znatno teži oblik bolesti je difuzna kožna lišmanioza koja se vrlo teško liječi, dugotrajna je i ostavlja trajne deformacije. Uzrokuju je *L. aethiopica* i *L. amazonensis* (LAINSON i SHAW, 1998.). Na području zapadne polutke ograničena je na Venezuelu i Dominikansku Republiku, te na Etiopiju i Keniju u Starom svijetu. Pojavljuje se u osoba s oštećenim staničnim imunosnim odgovorom. Diseminirane promjene nikad spontano ne zacjeljuju a izgledom podsjećaju na lepromatoznu lepru. Pogoršanja su česta bez obzira na primjenjenu terapiju. Zbog trajnih posljedica za oboljele, ovaj oblik se smatra značajnim javno zdravstvenim problemom (BAÑULS i sur., 2007.).

2.10.1.3. Kožno-sluznička lišmanioza

Kožno-sluznički oblik poznat je i kao *espundia*. Bolest je najčešća u Peruu i Boliviji.

Uzročnik je *L. braziliensis*, a znatno rijeđe *L. panamensis* i *L. guyanensis*. (SARAVIA i sur., 1985., NAIFF i sur., 1988., SANTRICH i sur., 1990., SAENZ i sur., 1991., OSORIO i sur., 1998.). Pojavljuje se mjesecima ili čak godinama nakon što su primarne kožne lezije zacijelile. Posljedica je metastaziranja uzročnika iz primarne lezije u gornju usnu, sluznicu usne šupljine i nazofarinksa, gdje nastanu nove opsežne ulceracije i propadanje tkiva (DAVIDSON, 1999.).

2.10.1.4. Visceralna lišmanioza

Visceralna lišmanioza je teška bolest kod koje se parazit razmnožava u stanicama monocitno-makrofagnog sustava cijelog organizma, naročito jetre, slezene i koštane srži. Uzročnici spadaju u kompleks *Leishmania donovani*.

Bolest je visoko endemijska na indijskom potkontinentu i Istočnoj Africi (WHO, 2013), gdje egzistira izrazito antropofilna vrsta *L. donovani* koju papatači prenose s čovjeka na čovjeka, a bolest se naziva *kala-azar*. To je najteži oblik visceralne lišmanioze i ukoliko se ne liječi redovito završava smrću (SALOTRA i SINGH, 2006.). Klinički se manifestira undulirajućom groznicom, gubitkom tjelesne težine, splenomegalijom, hepatomegalijom i/ili limfadenopatijom i anemijom (BAÑULS i sur., 2007.).

Godišnje se u svijetu pojavi 200 000 - 400 000 novih slučajeva visceralne lišmanioze, od kojih preko 90% u šest zemalja: Bangladeš, Brazil, Etiopija, Indija, Južni Sudan i Sudan (WHO, 2013).

Unutar dvije godine nakon ozdravljenja na koži pacijenata može nastati makulozni, papulozni, makulo-papulozni ili nodulozni egzantem (GASIM i sur., 2000.). To je kronični kožni oblik bolesti, tzv. post kala-azarni kožni lišmanoid (PKDL) (SALOTRA i SINGH, 2006.).

Psi i divlji kanidi su glavni rezervoari zoofilne i zoonotske visceralne lišmanioze koju uzrokuje *Leishmania infantum*. Iako je *L. infantum* najpoznatija kao uzročnik tzv. mediteranske visceralne lišmanioze, raširena je preko Srednjeg Istoka do Kine (RIOUX i sur. 1990.; cit. GRADONI 2001.).

Bolest se većinom javlja u djece, te odraslih imunokompromitiranih osoba. Osobe oboljele od AIDS-a su danas najznačajnija rizična skupina podložna invaziji u južnoj Europi.

Imunokompetentne odrasle osobe mogu biti invadirane s *L. infantum*, ali se tada bolest najčešće očituje kao lokalizirani, kožni oblik.

U južnoj Americi visceralnu lišmaniozu u ljudi uzrokuje *L. chagasi*, identična vrsti *L. infantum*, koju su na područja Novog svijeta po prvi puta unijeli Španjolci i Portugalci vjerojatno tijekom svojih prvih osvajačkih pohoda (MAURICIO i sur., 2000.; cit. SCHALLIG i OSKAM, 2002.), i koja je nakon toga višekratno unošena na američki kontinent (KUHLS i sur., 2011.).

2.11. Lišmanioza kod pasa

2.11.1. Epizootiologija

Lišmaniozu pasa na području Europe, Srednjeg istoka i Azije uzrokuje *L. infantum*, a posrednici su insekti iz roda *Phlebotomus*. Tu ne spadaju rijetki slučajevi kožne lišmanioze pasa koju ponekad može uzrokovati *L. tropica*.

Distribuciju bolesti određuju posebni ekološki i klimatski uvjeti koji su nužni za život kompetentnog insekta posrednika (ALONSO i sur., 2009.).

Bolest je enzootska u više od 70 zemalja svijeta. Prisutna je na područjima južne Europe, Afrike, Azije te južne i srednje Amerike (BANETH i sur. 2008.), a zadnjih godina prijavljeni su i slučajevi u SAD (PETERSEN i BARR, 2009.).

Procjenjuje se da je u zemljama Sredozemlja i jugozapadne Europe oko 2,5 milijuna pasa invadirano (MORENO i ALVAR, 2002.), a bolest se širi prema sjeveru i dosegla je područja Alpa i Pirineja (FERROGLIO, 2005.).

U Srednjoj i Južnoj Americi, gdje je u mnogim dijelovima bolest enzootska, uzročnik je *L. chagasi*, a posrednik *Lutzomyia longipalpis*. Klinička slika istovrsna je lišmaniozi koju uzrokuje *L. infantum* (PARANHOS-SILVA i sur., 1996.).

Subklinički invadirani psi jednako su pogodan rezervoar uzročnika za vektore kao i psi s različitim stupnjevima razvoja kliničkih znakova (MOLINA i sur., 1994.; LAURENTI i sur., 2013.), te su važan čimbenik održavanja bolesti u regiji.

2.11.2. Lišmanioza pasa u neenzootskim područjima Europe

Rizik od unošenja *L. infantum* u zemlje sjeverne Europe podržava činjenica o klimatskim i ekološkim promjenama koje pogoduju širenju bolesti i kompetentnog insekta posrednika (READY, 2010., DUJARDIN i sur., 2008., REISEN, 2010., PALATNIK - DE - SOUSA, 2011.).

Migracije pasa s njihovim vlasnicima u enzootska područja i natrag tijekom turističkih sezona pridonose unosu bolesti u sjevernija područja Europe. Otkriće kompetentnog vektora *Phlebotomus perniciosus* u zemljama srednje Europe kao što su Švicarska (GRIMM i sur., 1993.) i Njemačka (NAUCKE i SCHMITT, 2004.) upozorava na moguću pojavu bolesti na zemljopisnim širinama gdje nije bila prisutna (HARMS i sur., 2003., JACOB, 2008., SCHRODER i SCHMIDT, 2008.).

2.12. Prijenos lišmanija među psima bez prisustva biološkog vektora

Papatači su jedini člankonošci biološki prilagođeni prijenosu lišmanija. Neke vrste papatača su prilagođene prijenosu samo jedne vrste lišmanija dok su druge sposobne prenositi i nekoliko vrsta lišmanija (VOLF i sur., 2008.). Opisani su i načini prijenosa bez posredstva papatača od kojih su neki eksperimentalno dokazani.

Dokazani načini prijenosa uključuju: prijenos transfuzijom krvnih produkata (OWENS i sur., 2001.), vertikalni (transplacentarni) prijenos (ROSYPAL i sur., 2005., PANGRAZIO i sur., 2009., BOGGIATTO i sur., 2011.) i prijenos spolnim putem (SILVA i sur., 2009.).

Zasad nepotvrđeni načini prijenosa uključuju izravan prijenos ugrizom (DUPREY i sur., 2006.) i prijenos posredstvom drugih hematofagnih insekata. Krpelji i buhe su istraživani kao potencijalni vektori lišmanija ali njihova uloga u prijenosu nije dokazana (COUTINHO i sur., 2005., COUTINHO i LINARDI, 2007.).

Navedeni načini prijenosa lišmanija, bez posredstva papatača, od malog su značaja u epizootiologiji lišmanioze (BANETH i AROCH, 2008).

2.13. Lišmanioza u Hrvatskoj

U Hrvatskoj je zastupljena samo vrsta *L. infantum*, a održava se između nekih vrsta papatača i pasa na području Dalmacije (ŽIVIČNJAK i sur., 2005.). Povijesni pregled podataka o slučajevima visceralne lišmanioze u ljudi i pasa u Hrvatskoj od početka 20-og stoljeća,

pokazuje da je bolest stalna pojava u žarišnim područjima obalnog pojasa i otoka u središnjoj i južnoj Dalmaciji (ŽIVIČNJAK i sur., 2005.).

2.13.1. Epidemiološki podaci o lišmaniozi ljudi u Hrvatskoj

Prvi slučaj potkrijepljen mikroskopskim dokazom uzročnika datira iz 1930., a zabilježen je na Dubrovačkom području. Poslije šezdesetih godina prošlog stoljeća, u Hrvatskoj je zabilježen tek pokoji sporadični slučaj lišmanioze u ljudi.

PUNDA-POLIĆ i sur. (1998.) su ukazali su na značajan porast slučajeva viscerale lišmanioze u Dalmaciji tijekom Domovinskog rata (1991-1995.), te u poslijeratnom periodu. Većina tih slučajeva (64,3%) zabilježena je u djece mlađe od 10 godina.

Prema podacima Državnog zavoda za javno zdravstvo, u Republici Hrvatskoj je od 1999.-2011. godine zabilježeno 26 slučajeva viscerale lišmanioze u ljudi. Slučajevi kožnog oblika lišmanioze ne podliježu obveznom prijavljivanju, pa potpuno točnih podataka nema. Prema podacima NZZJZ Split, posljednjih godina u Dalmaciji se godišnje zabilježe 2-3 potvrđena slučaja kožnog oblika lišmanioze u ljudi. Prosječna godišnja incidencija viscerale lišmanioze nije se značajno mijenjala i iznosi 0,4/100 000 stanovnika (ANONYMOUS., 2003.). Bolest u ljudi stoga ima karakter sporadične pojave, a područje srednje i južne Dalmacije status hipoendemskog, slično susjednim zemljama zapadnog Mediterana. (npr. Italija, 0,6/100 000).

2.13.2. Povijesni i epizootiološki podaci o lišmaniozi pasa u Hrvatskoj

Prvi podaci o lišmaniozi pasa u Dalmaciji datiraju s početka 20-og stoljeća, (TARTAGLIA, 1937.). Isti autor je u Splitu tijekom 1935. i 1936., parazitološkom pretragom dokazao lišmanije u razmascima slezena kod 6 od 78 pasa latalica. CVJETANOVIĆ, (1953.) citira jednog stanovnika Dubrovnika kojem su tijekom desetak godina tri psa oboljela i uginula od "neizlječive pasje šuge". Bolesti u pasa nije pridavana posebna pozornost usprkos spoznaji da je pas najvažniji rezervoar i potencijalni izvor bolesti za čovjeka. Novootkriveni slučajevi lišmanioze u djece, na području Dubrovačko-neretvanske županije, tijekom domovinskog rata nanovo su aktualizirali problem ove bolesti u nas.

Istraživanja su nastavljena nakon prvog, gotovo neočekivano dijagnosticiranog slučaja viscerale lišmanioze u psa iz Konavala 1997. godine. Nakon toga, lišmanioza je u Hrvatskoj dokazivana parazitološkim (dokaz amastigota u obojenim razmascima punktata potkožnih

limfnih čvorova i koštane srži), serološkim (dot-ELISA i neizravna imunofluorescencija) i molekularnim metodama (ŽIVIČNJAK i sur., 1998., MARTINKOVIĆ i sur., 2001., ŽIVIČNJAK i sur., 2007.). Zimodemskom je analizom potvrđeno da se radi o vrsti *Leishmania infantum* (ŽIVIČNJAK i sur. 2005.). Iako se među klinički oboljelim psima nalazilo i onih iz sjevernih krajeva Hrvatske, za sve je utvrđeno da su neko vrijeme tijekom ljetnih mjeseci boravili u Dalmaciji.

Seroepidemiološkim istraživanjem među zdravim psima na splitskom području je ustanovljena srednja stopa prevalencije oko 15%, slično onoj u drugim zemljama južne Europe. (ŽIVIČNJAK i sur., 2005.). Trenutačno je lišmanioza pasa u Hrvatskoj enzootska u tri dalmatinske županije; od Rogoznice na zapadu do granice s Crnom Gorom na istoku, na sjeveru od granice s Republikom Bosnom i Hercegovinom do Jadranskog mora na jugu, uključujući i srednje i južno dalmatinske otoke); na tom području predstavlja problem za vlasnike pasa, veterinare, ali i potencijalnu opasnost po zdravlje ljudi (ŽIVIČNJAK i sur., 2005.).

2.13.3. Populacija vektora u Dalmaciji

U našoj zemlji utvrđena je prisutnost više vrsta papatača. Zastupljeno je 5 vrsta iz roda *Phlebotomus*, između kojih 3 spadaju u podrod *Larroussius* i dokazani su vektori *L. infantum* (*P. tobii*, *P. neglectus* i *P. perfiliewi*) (BOSNIĆ i sur. 2006.).

Prema vremenskim periodima u kojima su prikupljeni, može se zaključiti da su u područjima uključenim u istraživanje insekti posrednici aktivni barem od svibnja do sredine listopada. (BOSNIĆ i sur. 2006.).

2.14. Patogeneza

Umnažanje i širenje uzročnika u organizmu putem mononuklearnih fagocita iz kože u koštanu srž, slezenu i jetru, za posljedicu ima proliferaciju B-limfocita, makrofaga i plazma stanica, te migraciju eozinofilnih leukocita, što rezultira hepato i splenomegalijom generaliziranim povećanjem limfnih čvorova i hiperglobulinemijom.

Nekontrolirana proliferacija B-limfocita uz istodoban poremećaj u regulaciji funkcije T-limfocita rezultira stvaranjem velikih količina cirkulirajućih imunih kompleksa (LOPEZ i sur., 1996.). Odlaganje cirkulirajućih imunih kompleksa u stijenke krvnih žila rezultira vaskulitisom, poliartritisom, uveitisom i glomerulonefritisom. Glomerulonefritis je redovita

posljedica odlaganja imunih kompleksa u stijenkama krvnih žila glomerula bubrega i prisutan je u većine invadiranih pasa ponekad čak i bez kliničkih manifestacija.

Vaskulitis induciran taloženjem imunih kompleksa i aktivacijom sustava komplementa osnova je za nastanak tkivnih nekroza i pojavu patoloških promjena na koži, unutarnjim organima i očima u klinički oboljelih pasa. Prednji dijelovi oka posebno često su mjesto patoloških promjena (SLAPPENDEL, 1988.; PUCHOL i GONZALEZ, 1989.) koje se teško saniraju unatoč poduzetom liječenju.

Jaka anemija redovita je popratna pojava invazije lišmanijama. Smatra se da je posljedica skraćenja životnog vijeka eritrocita.

Trombocitopenija, trombocitopatija, produženo trombinsko vrijeme, prolongirano aktiviranje parcijalnog tromboplastinskog vremena i povećanje razgradnih produkata fibrinogena/fibrina pojave su koje ukazuju da infekcija lišmanijama primarno oštećuje hemostazu, koagulaciju i fibrinolizu. (FONT i sur. 1994.).

Iako su rijetka pojava, diseminirane intravaskularne koagulacije pojavljuju se u pasa s visceralkom lišmaniozom.

Nekoliko različitih mehanizama može dovesti do intravaskularnih koagulacija. Posljedice diseminirane intravaskularne koagulacije su krvarenja, smanjena perfuzija tkiva krvlju (što može rezultirati kolapsom), akutno zatajenje bubrežne funkcije, dispnea, krvavi proljev. Ova stanja se većinom javljaju u akutnoj fazi bolesti. Sve ove pojave temelje se na opstrukcijama u mikrocirkulaciji. Klinički se manifestiraju u obliku petehija, ekhimoza, hematurije i krvarenja iz nosa.

2.15. Klinička slika kod pasa

Bolest u pasa je teška i često smrtonosna. Obično je svrstana u visceralku lišmaniozu, jer je *L. infantum* uzročnik viscerale lišmanioze u ljudi, ali u pasa je osim unutarnjih organa obično zahvaćena i koža. Za razliku od kožne lišmanioze u ljudi, gdje su paraziti i upala ograničeni samo na kožu, u pasa su promjene na koži posljedica diseminacije uzročnika (FERRER i sur. 1988.). Stoga je je izraz „generalizirana lišmanioza“ prikladniji jer bolest zahvaća i unutarnje organe i kožu (STRAUSS-AYALI i BANETH, 2001.).

Međutim, svaka invazija lišmanijama u pasa ne znači nužno i kliničku bolest, pa je prevalencija subkliničkih invazija vrlo visoka (SOLANO-GALLEGO i sur., 2001a.; BANETH i sur., 2008.).

Klinički bolesnima od lišmanioze smatraju se psi koji imaju izražene kliničke znakove bolesti i/ili kliničko-patološke poremećaje (rutinskim hematološkim i biokemijskim pretragama utvrđena odstupanja od normalnih vrijednosti) uz potvrđenu invaziju s *L. infantum* (SOLANO- GALLEGO i sur. 2009.).

Psi sa subkliničkom invazijom ili klinički zdravi invadirani psi su oni kod kojih se kliničkom pretragom i rutinskim laboratorijskim testovima ne nalaze klinički simptomi odnosno kliničko-patološki poremećaji, ali su potvrđeno invadirani s *L. infantum*. U rutinske laboratorijske testove ubrajamo pretragu kompletne krvne slike, biokemijsku pretragu krvi i pretragu mokraće (SOLANO- GALLEGO i sur. 2009.).

Lišmanioza pasa može zahvatiti bilo koji organ, tkivo ili tjelesnu tekućinu i manifestira se nespecifičnim kliničkim znacima (CIARAMELLA i sur., 1997., KOUTINAS i sur., 1999., BANETH i sur., 2008.). Raznolikost kliničke slike posljedica je brojnih patoloških mehanizama koji se odvijaju u različitim organima i sustavima, te različitih tipova imunosnog odgovora pojedinog nosioca (BANETH i sur., 2008.).

Svi klinički znaci imaju spor i progresivan tijek i slab ili nikakav odziv na terapiju antibioticima ili glukokortikoidima. Tjelesna temperatura može varirati ali je obično normalna ili subnormalna. Imunosupresija koja redovito prati lišmaniozu može dovesti do razvoja pratećih bolesti, pa klinička slika može biti komplikirana demodikozom, piodermijom ili pneumonijom (FERRER, 1999.).

Promjene na koži su najčešći klinički znaci, i mogu se pojaviti zasebno ili skupa sa drugim kliničkim ili kliničko-patološkim poremećajima (FERRER, 1988.).

Uobičajena komplikacija je stafilokokna piodermija koja može biti površinska ili duboka. Prekomjerni rast noktiju (*onychogryphosis*) također se opisuje kao tipični znak bolesti (PENA i sur., 2000.).

Raspon očnih lezija je vrlo širok. Najčešća je upala rubova očnih kapaka (*blepharitis*) zajedno s upalom kože lica, iako nije rijetkost niti obostrani keratokonjunktivitis. U nekih pasa razvija se obostrani uveitis skupa s edemom rožnice i stvaranjem priraslica. Kao posljedica teškog uveitisa nastaje glaukom (FERRER, 1999.).

Kronično zatajivanje bubrega uobičajena je posljedica progrediranja bolesti i glavni je uzrok uginuća oboljelih pasa (COSTA i sur., 2003., ZATELLI i sur., 2003.). Glomerulonefritis i tubulointersticijski nefritis je najčešći patohistološki nalaz, dok je amiloidoza vrlo rijetka (COSTA i sur., 2003., ZATELLI i sur., 2003.).

5 do 10% pasa imaju epizode krvarenja iz nosa. Iako uzrok krvarenja nije potpuno razjašnjen smatra se da je rezultat upala i ulceracija nosne sluznice a ne poremećaja u mehanizmu grušanja krvi (FERRER, 1999.).

2.15.1. Stupnjevi kliničke bolesti

Prema SOLANO-GALLEGOM i sur., (2009.), na osnovi serološkog statusa, kliničkih znakova i laboratorijskih nalaza mogu se razlikovati četiri stupnja bolesti:

I Stupanj: **Blagi oblik bolesti** - psi su serološki negativni ili serološki pozitivni u niskom titru. Pojavljuju se blagi klinički znaci kao što su: periferna limfadenopatija ili papularni dermatitis (ORDEIX i sur., 2005., BOTTERO i sur., 2006.). U ovom slučaju potrebno je invadiranost potvrditi s drugim dijagnostičkim metodama kao što su citološke, histološke, imunohistokemijske metode i PCR.

II Stupanj: **Umjereno teški oblik bolesti** - psi imaju nisku do visoku razinu antilišmanijskih protutijela. Visokom razinom smatra se porast titra protutijela 3-4 puta u odnosu na utvrđeni laboratorijski cut-off. Pored kliničkih znakova navednih u I stupnju psi mogu pokazivati i difuzne ili simetrične kožne promjene kao eksfolijativni dermatitis i/ili prekomjeran rast noktiju, ulceracije (nosni hrbat, mukuši, koštane prominencije, kožno-sluznički spojevi), anoreksija, gubitak tjelesne težine, febra i krvarenje iz nosa (PETANIDES i sur., 2008.).

III Stupanj: **Teški oblik bolesti** - psi sa srednje visokom do visokom razinom antilišmanijskih protutijela. Pored kliničkih znakova navedenih u I i II stupnju psi mogu pokazivati promjene nastale kao posljedica stvaranja imunih kompleksa: vaskulitis, artritis, uveitis i glomerulonefritis.

IV Stupanj: **Vrlo teški oblik bolesti** - psi sa srednje visokom do visokom razinom antilišmanijskih protutijela. Pored kliničkih znakova navedenih u III stupnju javlja se plućna tromboembolija, ili nefrotični sindrom i potpuno zatajivanje bubrega.

2.16. Razudbeni nalaz

2.16.1. Makroskopske promjene

Makroskopski vidljive patološke promjene koje su uočavaju prilikom razudbi lešina pasa uginulih od lišmanioze veoma su raznolike (KEENAN i sur., 1984b.). Neke životinje imaju minimalne makroskopske lezije, dok se kod drugih pronađu teška oštećenja različitih organskih sustava. Lešine teško oboljelih životinje su redovito kahektične. Generalizirano povećani limfni čvorovi su uobičajen nalaz. Hepatomegalija i splenomegalija također može biti prisutna ali nešto rjeđe. Sitni, svijetlo obojeni čvorići (granulomi) mogu se naći u različitim organima kao što su bubrezi, jetra i gušterača. Promjene na koži su najčešće prisutne u obliku širokih bezdlačnih područja s ljuštenjem epitela kože glave i trupa. Rjeđe su promjene na koži izražene u vidu ulceracija ili čvorića (KEENAN i sur., 1984b.).

2.16.2. Mikroskopske lezije

Karakteristična tkivna lezija koja se javlja kod lišmanioze pasa je granulomatozna upalna reakcija s varijabilnom, premda općenito slabom uključenošću T -limfocita.

Ovdje nije riječ o pravoj granulomatoznoj reakciji na strano tijelo (ovaj tip reakcije javlja se samo kod miševa s imunodeficiencijom stanica T- limfocitne loze) već se radi o imunosnoj granulomatoznoj reakciji (reakcija kasne preosjetljivosti) kod koje su T- stanice još uvijek prisutne, premda u varijabilnom broju ovisno o jačini imunosnog odgovora domaćina (COTRAN i sur., 1999.). Paraziti i njima izazvana upalna reakcija opisana je u gotovo svim organima tijela uključujući i središnji živčani sustav.

U limfnim čvorovima obično nalazimo hiperplastične germinativne centre (hiperplazija B – limfocitne regije) s izraženim makrofagima i smanjenjem parakortikalnih područja (T-limfocitne regije). Slične promjene prisutne su i u slezeni.

U mnogim organima (jetra, bubrezi, nadbubrežna žlijezda, gušterača, crijeva, testisi) makrofagi se pojavljuju kao sitna žarišta rasijana u parenhimu (FERRER i sur. 1991.).

Osim granulomatozne reakcije kod pojedinih životinja oboljelih od lišmanioze uočavaju se i mikroskopske lezije tkiva koje su posljedica imunopatoloških mehanizama.

Primjer takvih lezija predstavlja glomerulonefritis koji se razvija u bubrežima kod pojedinih pasa, u početku kao membranozni ili membranoproliferativni a kasnije kroničan proces

(NIETO i sur., 1992.) a osim toga javlja se i uveitis (MOLLEDA i sur., 1999., INIESTA i sur., 2001.) i vaskulitis (PUMAROLA i sur., 1991.).

U koži, kao posljedica zajedničkog djelovanja različitih patoloških mehanizama (KOUTINAS i sur., 1992.) nastaju različite lezije s varijabilnom patohistološkom slikom, što izuzetno komplikira histopatološku interpretaciju i dijagnostiku kožnih bioptata.

Najčešće uočene mikroskopske kožne lezije (prema FERRER, 2002.):

- Nodularni ili difuzni granulomatozni dermatitis - u početku je reakcija lokalizirana uz kožne folikule i žljezde lojnice (granulomatozni lojni adenitis)
- Granulomatozni difuzni panikulitis (upala potkožnog masnog tkiva)
- Subkornealni pustularni dermatitis
- Vaskulitis mješanog tipa (neutrofilno-limfocitni)
- Interficialni dermatitis – epidermis/dermis (lihenoidna reakcija)

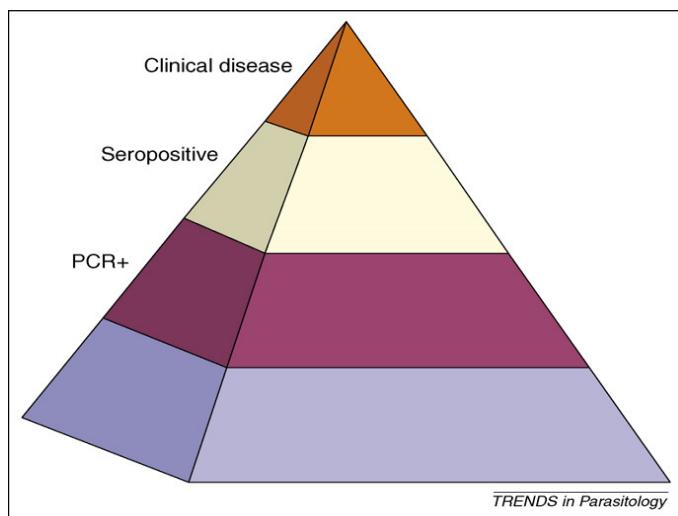
2.17. Prevalencija bolesti, seroprevalencija i prevalencija invazije u enzootskim područjima

U većine pasa invadiranih s *L.infantum* ne razvijaju se klinički znakovi bolesti, niti kliničko-patološki poremećaji, i prevalencija bolesti u enzootskim područjima je obično niža od 10% (SOLANO- GALLEGOS i sur. 2009.).

Psi s razvijenom kliničkom slikom bolesti su redovito serološki pozitivni na lišmanije, dok su klinički zdravi psi rijetko serološki pozitivni. Epidemiološke studije provođene molekulskim metodama dijagnostike u enzootskim područjima, pokazale su da prevalencija invazije može biti znatno veća od seroprevalencije i prevalencije bolesti (BANETH i sur., 2008.).

Može se zaključiti da je klinički manifestna lišmanioza pasa u enzootskim područjima samo “vrh ledenog brijega”, i da je većina populacije pasa izloženih uzročniku, invadirana bez vidljivih kliničkih znakova bolesti i pojave antilišmanijskih protutijela.

SHEMATSKI PRIKAZ DISTRIBUCIJE LIŠMANIOZE U POPULACIJI PASA U ENZOOTSKIM ŽARIŠTIMA (Shema 1.)



Shema 1. Preuzeto iz: BANETH, G., A. F. KOUTINAS, L. SOLANO-GALLEGO, P. BOURDEAU, L. FERRER (2008): Review: Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one: Trends in Parasitology Vol. 24 No 7, 324-330.

Vrh piramide (narančasto) predstavlja razmjerno malu podskupinu pasa s kliničkim znacima bolesti. Seropozitivni asimptomatski psi čine drugi podskup (žućkasto). Većina klinički bolesnih pasa i subklinički invadiranih seropozitivnih biti će PCR+. Treća podskupina uključuje subklinički invadirane, PCR+ ali serološki negativne invadirane pse (ljubičasto). Četvrta podskupina uključuje serološki negativne, neinvadirane pse (plavo). Vrlo malo pasa može biti serološki pozitivno i PCR negativno (nije prikazano).

Prisutnost pasa koji su tijekom cijelog svog života latentno invadirani, tipična je za enzootska područja i pridonosi održavanju uzročnika u populaciji. Prema istraživanjima, 30-70% invadiranih, neliječenih pasa iz enzootskog područja će razviti kliničku sliku bolesti tijekom 2-3 godine od dijagnoze (PARADIES i sur., 2010.). S druge strane, ne postoji laboratorijski test ili kombinacija testova, kojima bi se sa sigurnošću moglo predvidjeti da li će se razviti klinički oblik bolesti ili ne (ROURA i sur., 2013.). Učinkovit nadzor bolesti je osobit problem jer su i simptomatski i subklinički invadirani psi izvor uzročnika za vektore (MOLINA i sur., 1994.), a dostupni antilišmanijski pripravci su ograničeno učinkoviti u liječenju pasa (HERWALDT, 1999., GRADONI, 2001). Raspon prevalencija u enzootskim područjima ovisi o ekološkim i klimatskim čimbenicima koji izravno utječu na populacije vektora.

Pri povoljnim uvjetima za prijenos uzročnika, što podrazumijeva dovoljnu gustoću populacije vektora i invadiranih pasa, invazija u populaciji pasa širi se brzo i opsežno (OLIVA i sur., 2006., QUINELL i sur., 1997).

2.18. Uloga tipa imunosnog odgovora u razvoju kliničke slike

Pojava kliničkih znakova bolesti u invadiranih pasa ovisi o sposobnosti makrofaga nosioca da učinkovito unište uzročnika. Aktivnost makrofaga određena je razinom i omjerom različitih skupina citokina (RHALEM i sur. 1999.).

U literaturi su opisani različiti tipovi imunosnog odgovora i kliničkih simptoma u pasa invadiranih s *L. infantum*. Invazija u psa može biti subklinička, ili teška (neizlječiva) bolest (BOTTERO i sur., 2006.). U prvom slučaju djelotvoran zaštitni imunosni odgovor rezultat je uspostavljanja stanične obrane. Podskupina CD4 T-limfocita produkcijom citokina od kojih su najznačajniji IFN- γ , IL-2 i TNF- α , aktiviraju i potječu makrofage na lišmanicidno djelovanje. Kliničko oboljenje povezano je s produkcijom velikih količina imunoglobulina i redukcijom ili potpunim izostankom staničnog imunosnog odgovora. Medijatori ovog tipa imunosnog odgovora su mješavina citokina Th1 i Th2 stanica. Nastali humoralni imunosni odgovor nema zaštitni učinak (ALVAR i sur., 2004., BANETH i sur., 2008.).

Klinička bolest može varirati od blagog papularnog dermatitisa povezanog s specifičnim staničnim imunosnim odgovorom i slabim humoralnim odgovorom (ORDEIX i sur., 2005.), pa do teškog oboljenja praćenog oštećenjem bubrega uslijed glomerulonefritisa nastalog odlaganjem velikih količina imunih kompleksa u endotel kapilara bubrežnih glomerula.

2.19. Dijagnostika

Rano otkrivanje invadiranih pasa, napose prije pojave kliničkih simptoma, a u nekim slučajevima i prije pojave serokonverzije ključno je u kontroli širenja bolesti na životinje i ljude (MAIA i CAMPINO, 2008.).

2.19.1. Klinička dijagnostika

Klinička dijagnostika lišmanioze je kompleksna s obzirom na široki raspon kliničkih manifestacija i patoloških poremećaja, te njihovu nespecifičnost. Kliničke manifestacije ovise o stadiju bolesti, stanju imunosnog sustava nositelja, prethodno poduzetoj specifičnoj terapiji i drugim čimbenicima (CIARAMELLA i sur., 1997.).

2.19.2. Laboratorijska dijagnostika

Učinkovit dijagnostički test, osim što mora biti u stanju potvrditi kliničku sumnju na bolest te utvrditi invaziju u subklinički invadiranih pasa, također treba imati visoku razinu osjetljivosti, specifičnosti i reproducibilnosti, mora biti jednostavan za izvođenje, ekonomski pristupačan, te izvediv u regionalnim laboratorijima i prilagodljiv upotrebi na terenu. U idealnom slučaju, test mora detektirati sve invadirane pse, po mogućnosti korištenjem bioloških uzoraka koji se dobiju neinvazivnim metodama (MAIA i CAMPINO, 2008.).

Laboratorijska dijagnostika lišmanioze pasa izvodi se direktnim metodama (dokaz parazita ili njegove DNK) i indirektnim metodama (dokaz specifičnih protutijela) pomoću različitih metoda:

Trajanje invazije lišmanijama može varirati, ali u slučajevima progresivne bolesti dijagnostički biljezi postaju pozitivni slijedećim redom (OLIVA i sur., 2006.):

- 1) PCR - detekcija lišmanijske DNK u koštanoj srži / perifernoj krvi
- 2) seropozitivnost/ parazitološki dokaz uzročnika u tkivima
- 3) razvoj kliničkih simptoma

Osjetljivost metode lančane reakcije polimerazom (PCR) najviša je neposredno nakon invazije, ali joj osjetljivost tijekom vremena opada. Nasuprot tome, osjetljivost serološke pretrage je niska u početku invazije, ali tijekom mjeseci raste (GRADONI, 2002.). Ovo su razlozi zbog kojih je nužan multidijagnostički pristup i zbog kojih ne postoji jedan test koji bi detektirao sve invadirane životinje.

2.19.2.1. Direktne metode dijagnostike

2.19.2.1.1. Parazitološka dijagnostika

Parazitološka dijagnostika uključuje mikroskopsku pretragu, uzgoj uzročnika *in vitro* i biološki pokus (SCHNUR i JACOBSON, 1987.).

2.19.2.1.1.1. Mikroskopska pretraga

Citološka ili histološka identifikacija lišmanijskih amastigota u obojenim otiscima/razmascima punktata limfnih čvorova, slezene, kože, koštane srži ili drugih tkiva omogućuje razmjerno brzu dijagnostiku invazije. Međutim ove metode nisu visoko osjetljive (BANETH i AROCH, 2008.).

2.19.2.1.1.2. Izdvajanje i uzgoj uzročnika *in vitro*

Iako je specifičnost metode 100%, izdvajanje i uzgoj parazita *in vitro* neprikladan je za rutinsku dijagnostiku jer vrlo mali broj laboratorija uopće ima mogućnosti provedbe metode. Kod uzoraka prikupljenih u terenskim uvjetima postoji i velika vjerojatnost kontaminacije mikroorganizmima (GRADONI, 1999.).

Mogućnost uzgoja lišmanija *in vitro* je nužno i za dobivanje dovoljnog broja parazita za izoenzimatsku identifikaciju, za proizvodnju antigena u serološkoj dijagnostici, za eksperimentalne infekcije, te za *in vitro* testiranje lijekova i molekularnu identifikaciju (MAIA i CAMPINO, 2008.).

2.19.2.1.1.3. Biološki pokus

Prisutnost lišmanija može se dokazati inokulacijom ispitivanih materijala zlatnim hrćima (*Mesocricetus auratus*). Ova metoda se ne upotrebljava za dijagnostiku jer je za dobivanje rezultata ponekad potrebno i nekoliko mjeseci. Amastigoti se poslije žrtvovanja traže u slezeni ili jetri (MAIA i CAMPINO, 2008.).

2.19.2.1.2. Molekularne metode

Posljednjih godina uvelike je istraživana primjenljivost metoda s lančanom reakcijom polimeraze (PCR) za dokazivanje *L. infantum*. Razvijene su razne vrste početnica i PCR je potvrđen kao osjetljiva metoda za detekciju uzročnika u klinički bolesnih ili parazitološki potvrđeno invadiranih pasa (ASHFORD i sur., 1995., MATHIS i DEPLAZES, 1995., BERRAHAL i sur., 1996., REALE i sur., 1999., ROURA i sur., 1999.).

Sama tehnika PCR obuhvaća nekoliko različitih metoda s upotrebom različitih ciljnih sekvenca na genomskoj DNK ili na DNK kinetoplasta (kDNK). Trenutno su u upotrebi tri

različite PCR metode: klasični (*conventional*) PCR, ugniježđeni (*nested*) PCR i *real-time* PCR (GOMES i sur., 2008., MAIA i CAMPINO, 2008., MIRÓ i sur., 2008.).

Real-time PCR je napredna kvantitativna metoda kojom se može otkriti izuzetno mala količina parazita u usporedbi s klasičnim PCR (FRANCINO i sur., 2006.). Omogućava kvantifikaciju (određivanje količine) lišmanija u tkivima što je od velike važnosti za dijagnostiku i praćenje učinkovitosti terapije (PENNISI i sur., 2005b., MANNA i sur., 2008a.).

Pretrage na kDNK pokazale su veću osjetljivost za direktno otkrivanje u invadiranom tkivu (GOMES i sur., 2008., MAIA i CAMPINO, 2008., MIRÓ i sur. 2008.). PCR se može izvoditi na DNK ekstrahiranoj iz tkiva, krvi, tkivnih tekućina pa čak i iz patohistoloških uzoraka.

PCR iz tkiva koštane srži, limfnih čvorova, slezene ili kože su visoke osjetljivosti i specifičnosti (MAIA i sur., 2009., MANNA i sur., 2008a., REIS i sur., 2009.). PCR na uzorcima pune krvi, kože i mokraće je slabije osjetljiva od PCR-a iz prethodno navedenih tkiva (SOLANO-GALLEGO i sur., 2007., MANNA i sur., 2008a.).

2.19.2.1.3. Primjena PCR u klinički zdravih pasa

Prisutnost lišmanijske DNK u krvi i drugim tkivima klinički zdravih pasa u enzootskim područjima dokaz je kontakta s uzročnikom i potvrda da su takve životinje potencijalni izvor uzročnika (SOLANO-GALLEGO i sur., 2001a.), iako se kod njih tijekom cijelog života ne moraju razviti klinički znaci bolesti (OLIVA i sur., 2006.).

Rezultate PCR pretraga u klinički zdravih pasa treba oprezno interpretirati i uzeti u obzir svrhu pretraživanja; npr. pretraga u svrhu sprječavanja unosa invadirane životinje u neenzootsko područje, u kojem bi se invazija mogla proširiti pomoću lokalne populacije papatača, ili u svrhu prevencije prijenosa uzročnika putem transfuzije krvnih produkata invadiranog davatelja. Nije preporučljivo poduzimanje antilišmanijske terapije u klinički zdravih pasa isključivo na temelju rezultata pretrage PCR (SOLANO-GALLEGO i sur. 2009.).

2.19.2.2. Indirektne metode dijagnostike

2.19.2.2.1. Serološke metode (detekcija specifičnih protutijela)

Serološke metode imaju veću osjetljivost od parazitoloških. U svakodnevnoj upotrebi su različite serološke metode u kojima se koriste različiti lišmanijski antigeni. Pogodne su za kliničku dijagnostiku i masovna orientacijska testiranja pasa.

Za dokazivanje specifičnih serumskih protutijela (IgG) uobičajeno se koriste kvantitativne serološke metode kao što su neizravna imunofluorescencija (Immunofluorescence antibody test – IFAT) i imunoenzimni test (ELISA).

Klinički bolesni psi pored hematoloških i bjelančevinskih alteracija razvijaju jak humoralni odgovor (CAMPINO i sur., 2000.). Međutim, samo prisustvo antilišmanijskih protutijela nije siguran znak bolesti. Stoga je preporučljivo izvesti više od jednog serološkog testa da bi se dijagnoza potvrdila (CAMPINO, 2002.), te nastaviti praćenje i ponoviti testiranje nakon 3 mjeseca (BANETH i AROCH, 2008.).

2.19.2.2.1.1. Neizravna imunofluorescencija (IFAT)

Za neizravnu imunofluorescenciju koriste se cijeli promastigoti kao antigen. Visoko je specifična i osjetljiva metoda za otkrivanje lišmanioze u pasa s izraženom kliničkom slikom, ali osjetljivost joj pada kod pretraživanja klinički zdravih invadiranih pasa (METTLER i sur., 2005.).

Granični titar (Cut-off titar) za razlučivanje pozitivnih od negativnih rezultata varira od 1:40 do 1:160 između pojedinih laboratorija (FERROGLIO i VITALE, 2006.).

Iako IFAT predstavlja referentni serološki test njegova upotrebljivost je ograničena subjektivnom interpretacijom rezultata, obično teško ponovljivih između različitih laboratorija (GRADONI, 1999.), zbog različitih cut-off vrijednosti koje pojedini laboratorijski postavljuju.

2.19.2.2.1.2. Imunoenzimni test (ELISA)

Osjetljivost i specifičnost imunoenzimnog testa (ELISA) uvelike ovisi o upotrijebljenom antigenu, koji većinom uključuje topivi ekstrakt promastigota i rekombinantne ili pročišćene proteine (MIRÓ i sur. 2008.).

Imunoenzimni testovi (ELISA) s rekombinantnim peptidima su vrlo specifični ali ovisno o upotrijebljenom antigenu, mogu biti slabije osjetljivi za pretraživanje klinički zdravih invadiranih pasa, (METTLER i sur., 2005., PORROZZI i sur., 2007.). Imunoenzimni test s rekombinantnim antigenima K9, K26 i K39 sub epitopima je pokazao visoku specifičnost i osjetljivost (BOARINO i sur., 2005.).

2.19.2.2.1.3. Ostali serološki testovi

Testovi bazirani na imunokromatografiji su jednostavnji za primjenu i obično imaju visoku specifičnost, ali im osjetljivost varira i svojstva im još nisu optimizirana (METTLER i sur., 2005.).

2.19.2.2.1.4. Ograničenja seroloških metoda

Mogu se pojaviti lažno pozitivni rezultati zbog križnih seroloških reakcija s drugim patogenima, naročito u područjima s *Trypanosoma cruzi* (sjeverna, srednja i južna Amerika) ili s drugim vrstama lišmanija (FERREIRA i sur., 2007., PORROZZI i sur., 2007.), te kod testova koji koriste neprerađeni antigen cijele lišmanejske stanice. Križne se reakcije rjeđe pojavljuju kod metoda u kojima se koriste rekombinantni peptidi kao što su rA2, rK9, rK26 i rK39 (BOARINO i sur., 2005., PORROZZI i sur., 2007.).

Serološke pretrage otkrivaju većinu klinički bolesnih (CIARAMELLA i sur., 1997., KOUTINAS i sur., 1999.) i dio subklinički invadiranih pasa koji može doseći i 50% od ukupno seropozitivne populacije pasa (FISA i sur., 1999., SIDERIS i sur., 1999.).

Međutim, serološke pretrage ne otkrivaju invadirane pse prije pojave serokonverzije ili one kod kojih do serokonverzije nikad neće niti doći; ne otkrivaju niti pse koji su bili seropozitivni ali je kod njih došlo do seroremisije iako su ostali invadirani (DYE i sur., 1992., DYE i sur., 1993., PINELLI i sur., 1994., QUINELL i sur., 1997.). Seroprevalencija lišmanioze pasa je pozicionirana između prevalencije bolesti i prevalencije invazije, a to objašnjava i zašto je ova posljednja obično podcijenjena u epizootiološkim studijama (GRADONI, 1999.).

2.20. Liječenje

Kombinacije meglumin antimonata s allopurinolom (DENEROLLE i BOURDOISEAU, 1999.) ili miltefosina s allopurinolom (MANNA i sur., 2008b., MIRÓ i sur., 2009.) smatraju se prvim izborom protokola za liječenje. Različiti protokoli značajno se međusobno razlikuju s obzirom na doze, učestalost primjene i trajanje liječenja (NOLI i AUXILIA, 2005.).

Klinički odgovor na liječenje bolesnih pasa može varirati od slabog do dobrog, ovisno prvenstveno o kliničko patološkom statusu u trenutku početka liječenja. U pasa s oštećenom funkcijom bubrega treba očekivati slabiji odgovor na poduzeto liječenje u usporedbi sa psima u kojih je bubrežna funkcija očuvana. Većina pasa pokazuje kliničko poboljšanje tijekom prvih mjesec dana liječenja (PENNISI i sur., 2005b., MANNA i sur., 2008a.), dok je u nekim slučajevima potreban duži vremenski period do pojave kliničkog poboljšanja.

Obično je potreban duži vremenski period da bi se normalizirao (snizio) titar serumskih protutijela i uspostavile fiziološke vrijednosti i međusobni omjer serumskih bjelančevina.

Kod nekih pasa mogu se pojaviti nuspojave na primijenjene pripravke, što treba razlikovati od pogoršavanja same bolesti (NOLI i AUXILIA, 2005.).

2.21. Primjena seroloških pretraga u kontroli učinkovitosti liječenja

O praćenju razine specifičnih protutijela u svrhu procjene kliničkog poboljšanja nakon provedenog liječenja postoje oprečna mišljenja. Starija istraživanja pokazala su da razina protutijela ne pada u prvih mjesec dana od početka liječenja (FERRER i sur., 1995.).

Novija istraživanja pokazala su spor i progresivan pad razine IgG i IgA, što je povezano s povlačenjem kliničkih znakova bolesti (SOLANO-GALLEGO i sur., 2001b., RODRIGUEZ i sur., 2006.).

Stoga se preporučuje ponavljanje kvantitativnih seroloških testova u istom laboratoriju šest mjeseci nakon početka liječenja zbog razmjerno dugog vremena poluživota IgG (ANDERSON i sur., 2006.) i uobičajeno visoke početne razine specifičnih protutijela u bolesnih pasa. Radi utvrđivanja kinetike protutijela poželjno je pretražiti početni i sve ostale sljedeće uzorce seruma istovremeno u tijeku iste pretrage (SOLANO-GALLEGO i sur. 2009.). Metodom indirektne imunofluorescencije smanjenje razine titra protutijela može se smatrati značajnim ako je razlika visine titra između prvog i slijedećeg uzorka veća od dvostrukе. Neki psi pokazuju značajan pad razine protutijela što je povezano s poboljšanjem

kliničkog stanja unutar 6 mjeseci do godinu dana od početka liječenja, dok kod drugih ne dolazi do sniženja titra protutijela iako im se klinička slika popravlja.

Nasuprot tome, značajan porast razine protutijela treba smatrati znakom recidiva/pogoršanja, posebno nakon prestanka primjene lijekova (SOLANO-GALLEGO i sur. 2009.).

2.22. Prognoza

Iako primjena antilišmanijskih pripravaka obično dovodi do kliničkog poboljšanja, nerijetko nakon prestanka liječenja dolazi do pogoršanja, što pokazuje da uzročnik nije eliminiran (NOLI i AUXILIA, 2005., SOLANO-GALLEGO i sur. 2009.).

2.23. Kliničko praćenje

Prema ROURA i sur., (2013.), u svrhu prognoze tijeka i ishoda bolesti, na osnovu kliničke i laboratorijske procjene, pse se ovisno o stadiju lišmanioze može razvrstati u nekoliko skupina. Nakon prve procjene, pse treba periodički pregledavati i razvrstati ovisno o progresiji ili regresiji bolesti (SOLANO- GALLEGO i sur., 2009; OLIVA i sur., 2010; PALTRINIERI i sur., 2010.).

Stadij A - Izloženost

Psi su klinički zdravi ili sa simptomima drugih bolesti. Invadiranost se ne može dokazati mikroskopski, uzgojem ili PCR-om. Titar specifičnih antilišmanijskih protutijela je manji od četverostrukе vrijednosti laboratorijskog praga (obično 1:80). Takvi psi žive ili su proveli više od jedne sezone aktivnosti vektora u enzootskom području.

Prognoza je povoljna.

Praćenje: Veterinarski pregled i procjena titra specifičnih protutijela su svaka 2-4 mjeseca.

Stadij B - Invadiranost

Psi su klinički zdravi ili sa simptomima drugih bolesti. Parazit je dokazan mikroskopski, kulturelno ili PCR-om. Pas je serološki negativan ili ima titar specifičnih antilišmanijskih protutijela manji od četverostrukе vrijednosti laboratorijskog praga.

Prognoza je povoljna, a ukoliko se počnu razvijati znaci bolesti tada je neizvjesna.

Praćenje: Veterinarski pregled, hematološke, biokemijske, urološke i serološke pretrage svaka 2-4 mjeseca tijekom prve godine. Ukoliko nema serokonverzije, daljnji pregledi su svakih 6-12 mjeseci.

Stadij C - Klinička bolest

Takvi psi pokazuju kliničke znakove i/ili kliničko-patološke poremećaje karakteristične za lišmaniozu. Invadiranost je dokazana mikroskopski, kulturelno ili PCR-om, te seropozitivnošću u bilo kojem opsegu. Psi sa manifestnom kliničkom slikom i titrom specifičnih protutijela jednakim ili većim od četverostrukе vrijednosti laboratorijskog praga, smatrati će se klinički bolesnima od lišmanioze, čak i bez dokaza uzročnika.

Prognoza ovisi o stupnju oštećenja bubrega i odgovoru na liječenje.

Prognoza je povoljna u slučaju kliničke remisije unutar 3 mjeseca od početka liječenja, pada titra protutijela unutar 6-12 mjeseci i smanjenja količine uzročnika utvrđene kvantitativnim PCR testom tijekom mjesec dana. U suprotnom, prognoza je neizvjesna.

Praćenje: Veterinarski pregled koji uključuje hematološke, biokemijske i urološke pretrage 4-6 tjedana od početka liječenja. Pretrage treba ponavljati svaka 2-4 mjeseca tijekom prve godine. Četiri do šest mjeseci od početka liječenja treba izvršiti prvu provjeru titra protutijela, a daljnje kontrole provoditi svakih 6-12 mj. do kraja života psa. Preporučeno je i provjeravati količine uzročnika kvantitativnim PCR testom.

Stadij D - Klinički teški oblik bolesti

U ovu skupinu spadaju psi sa nefropskom proteinurijom, teško oštećenim bubrežima (IRIS, 3. ili 4. stupanj), teškim oštećenjima očiju koja mogu dovesti do gubitka vida i/ili nužnog uvođenja imunosupresijske terapije, teškim oštećenjima zglobova koja dovode do poremećaja lokomocije i/ili nužnog uvođenja imunosupresijske terapije i psi s teškom popratnom bolesti. Prognoza je neizvjesna do nepovoljna, što ovisi o stupnju oštećenja bubrega i odgovoru na liječenje.

Praćenje: Kao i za stadij C, s tim što učestalost i vrste pretraga treba prilagoditi kliničkom stanju. Obično se pretrage provode svakih 7-10 dana tijekom prvih mjeseci dana liječenja, a dalje svakih 1-2 mjeseca.

Stadij Ea - Bez odziva na poduzeto liječenje (Ea)

Nema kliničkog odziva na propisanu terapiju

Stadij Eb – Kliničko pogoršanje nastupa ubrzo po prestanku primjene propisane terapije

Prognoza stadija Ea i Eb je neizvjesna do nepovoljna, što ovisi o stupnju oštećenja bubrega i učinku terapije.

Praćenje: Kao i za stadij D.

2.24. Pretraživanje klinički zdravih pasa na prisutnost lišmanijske DNK

Prevladava stav da bi zdrave pse u enzootskim područjima trebalo pretražiti na lišmanijsku DNK samo u slučajevima ukoliko se izvoze u ne-enzootska područja, koriste kao davatelji krvi, ukoliko su njihovi vlasnici imunosuprimirane osobe, ili u svrhu epizootioloških istraživanja. U suprotnom, preporučuje se korištenje samo seroloških pretraga ili seroloških pretraga u kombinaciji s PCR (SOLANO-GALLEGO i sur., 2009.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Lišmanioza je bolest koja se odlikuje brojnim osobinama karakterističnim za emergentnu zoonozu. Iz prethodnih istraživanja evidentno je da je unutar enzootskog područja Hrvatske lišmanijom subklinički i klinički invadirano više od 10% pasa i oni predstavljaju izvor uzročnika za vektore. Čak 50% invadiranih pasa djeluje zdravo (GRADONI, 2002), a postoji mnogo interpretacija značenja „bolest“ i „invadiranost“ u tzv. asimptomatskoj populaciji pasa (CABRAL i sur., 1998., GRADONI, 2002., ALVAR i sur., 2004., CARDOSO i sur., 2007.). Smatrali smo da je na temelju više seroloških i molekularnih pretraga kod prividno zdrave populacije pasa moguće dobiti kvalitetan uvid u stupanj raširenosti invazije u enzootskim i njima graničnim područjima. Zbog poteškoća u interpretaciji pojmove „bolest“ i „invadiranost“, koji su rezultat patogeneze i ograničenja primjene dostupnih dijagnostičkih postupaka, naš je cilj također bio istražiti mogućnost uporabe drugaćijih ili modificiranih metoda, koje bi mogle zamijeniti kod nas primjenjivane dijagnostičke metode (trijaža IFAT-om zdrave populacije i IFAT ili jedan brzi test kod klinički sumnjivih pasa). Istraživana je kombinacija dijagnostičkih metoda koja bi bila optimalna za primjenu u trijaži unutar enzootskog područja, te u graničnim područjima sa svrhom detekcije subkliničkih invazija ili kontakta s parazitom (dokaz DNK uzročnika), ali i detekcije bolesnih pasa (titar specifičnih protutijela i dokaz DNK uzročnika), te procjena širenja bolesti i prepoznavanje novih žarišta prije kliničke manifestacije.

Standardizacija metoda dijagnostike bolesti omogućiti će implementaciju kvalitetne trijaže i praćenja lišmanioze pasa, kako u enzootskom području tako i na područjima gdje se bolest dosad nije pojavljivala.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Zemljopisni podaci

Istraživanje je provedeno na arhivskim uzorcima pune krvi i krvnih seruma pasa koji potječu iz poznatih žarišta unutar enzootskog područja (Sinj, Knin), te pasa iz mjesta više ili manje udaljenim od žarišta, u kojima dosad nije bilo detektiranih slučajeva lišmanioze kod pasa (Trilj i Vrlika), odnosno od pasa koji žive izvan enzootskog područja, ali u njegovoј blizini (Benkovac, Biograd n/M). Mjesta obuhvaćena ovim istraživanjem nalaze se na području tri dalmatinske županije: Zadarske (Skupina I), Šibensko – kninske (Skupina II) i Splitsko – dalmatinske (Skupina III).

Skupina I - Zadarska županija

Grad Benkovac ($44^{\circ}02' SZ\check{S}$; $15^{\circ}37' IZD$; 177 m n/m) i 3 okolna sela: Lišane Ostrovičke ($43^{\circ}58' SZ\check{S}$; $15^{\circ}46' IZD$; 126 m n/m), Perušić Benkovački ($44^{\circ}00' SZ\check{S}$; $15^{\circ}38' IZD$; 182 m n/m), i Podgrađe ($44^{\circ}01' SZ\check{S}$; $15^{\circ}40' IZD$; 251 m n/m).

Ukupno je s ovog terena prikupljen po 21 uzorak pune krvi i krvnih seruma .

Grad Benkovac nalazi se u sjevernoj Dalmaciji, smješten oko 30 km istočno od Zadra i 20 km sjeveroistočno od Biograda na Moru. Smješten je na istočnom rubu ravnokotarske ravnice gdje područje Ravnih Kotara prijelazi u krševito područje Bukovice. Klima je submediteranska (s nešto hladnijim zimama i toplijim ljetima).

Grad Biograd n/M ($43^{\circ}56' SZ\check{S}$; $15^{\circ}27' IZD$; 0-45 m n/m) i obližnje selo Vrana ($43^{\circ}57' SZ\check{S}$; $15^{\circ}33' IZD$; 46 m n/m).

Ukupno su s ovog terena prikupljena po 43 uzorka pune krvi i krvnih seruma.

Grad Biograd n/M je priobalno mjesto. Klima je mediteranska (sa suhim i toplim ljetima te vlažnim i blagim zimama. Kao i cijelom dužinom kopnenog priobalja, područje Biograda n/M je mediteransko područje zimzelene vegetacije (hrast crnika, alepski bor, dalmatinski crni bor). U neposrednoj blizini sela Vrana i samo nekoliko km od Biograda n/M, nalazi se jedno od tri najveća prirodna jezera u Hrvatskoj, Vransko jezero površine 30 km².

Skupina II - Šibensko-kninska županija

Grad Knin ($44^{\circ}02' SZ\check{S}$; $16^{\circ}12' IZD$; 220 m n/m) i dva okolna sela: Vrpolje ($44^{\circ}04' SZ\check{S}$; $16^{\circ}13' IZD$; 276 m n/m) i Potkonje ($44^{\circ}01' SZ\check{S}$; $16^{\circ}12' IZD$; 226 m n/m).

Ukupno su s ovog terena prikupljena po 43 uzorka pune krvi i krvnih seruma.

Skupina III - Splitsko-dalmatinska županija

Grad Sinj ($43^{\circ}42' SZ\check{S}$; $16^{\circ}38' IZD$; 327 m n/m) i tri okolna sela: Brnaze ($43^{\circ}40' SZ\check{S}$; $16^{\circ}39' IZD$; 327-348 m n/m), Glavice ($43^{\circ}42' SZ\check{S}$; $16^{\circ}39' IZD$; 318 m n/m) i Lučane ($43^{\circ}43' SZ\check{S}$; $16^{\circ}35' IZD$; 364 m n/m).

Ukupno je s ovog terena prikupljeno po 59 uzoraka pune krvi i krvnih seruma.

Grad Vrlika ($43^{\circ}55' SZ\check{S}$; $16^{\circ}24' IZD$; 470 m n/m) i četiri okolna sela: Podosoje ($43^{\circ}53' SZ\check{S}$; $16^{\circ}25' IZD$; 398 m n/m), Ježević ($43^{\circ}55' SZ\check{S}$; $16^{\circ}27' IZD$; 380 m n/m), Cetina ($43^{\circ}58' SZ\check{S}$; $16^{\circ}26' IZD$; 380 m n/m) i Kosore ($43^{\circ}55' SZ\check{S}$; $16^{\circ}24' IZD$; 470 m n/m).

Ukupno je s ovog terena prikupljeno po 36 uzoraka pune krvi i krvnih seruma.

Grad Trilj ($43^{\circ}37' SZ\check{S}$; $16^{\circ}43' IZD$; 301 m n/m)

Ukupno je s ovog terena prikupljeno po 40 uzoraka pune krvi i krvnih seruma .

Gradovi Knin, Sinj, Vrlika i Trilj nalaze se u dalmatinskoj zagori. To su brdovita područja, dobro pokrivena tipičnom mediteranskom vegetacijom. Prevladava kontinentska klima sa oštrim i vrlo hladnim zimama te vrućim ljetima sa čestim lokalnim pljuskovima. Zimske jutarnje temperature spuštaju se ispod $-10^{\circ}C$, dok su dnevne od $3-6^{\circ}C$. Ljetne temperature su iznad $35^{\circ}C$. Padaline su često obilne. Zimi je čest snijeg, a ljeti pljuskovi kiše. Od vegetacije prevladavaju poluzimzelene i listopadne šume hrasta medunca (*Qu. pubescens*) s bjelograbom i crnogradom (*Ostrya*).

4.2. Psi

Uzorci su prikupljeni u okviru Projekta MZOS „Raširenost lišmanioze pasa i papatača posrednika u hrvatskom priobalju“ (voditelj T. Živičnjak, 053-0532266-2224), u razdoblju od polovice listopada 2010. do polovice siječnja 2011. Uzorkovanje je provodeno izvan sezone

aktivnosti vektora, a uključeni su psi raznih dobnih skupina. Ukupno su uzorkovanjem obuhvaćena 242 naizgled zdrava psa, stara od 2 -156 mjeseci, u privatnom vlasništvu, uz suglasnost vlasnika, i u njihovim dvorištima. Prilikom uzorkovanja zabilježeni su podaci o vlasniku, ime psa, spol, dob, pasmina i kategorija.

Svaka županija predstavlja jednu skupinu.

Porijeklo uzoraka po županijama (skupine), pregled dobi, kategorije i spola prikazan je u Tablici 1.

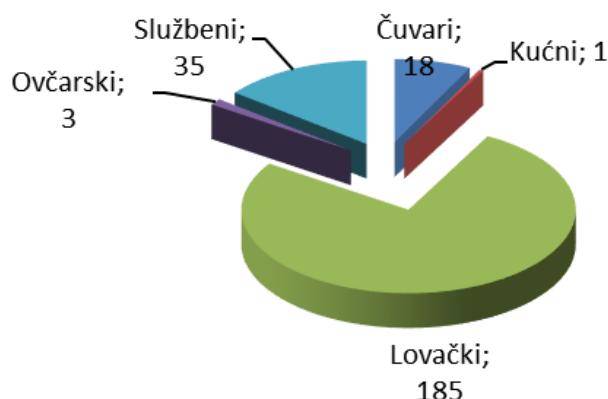
Vlasnici pasa uključenih u istraživanje su tijekom veljače 2011.godine, pismeno obaviješteni o rezultatima testa neizravne imunofluorescencije (IFAT). Vlasnicima seropozitivnih pasa je objašnjena priroda bolesti, mogućnosti liječenja i prognoza. Njihovi nadležni veterinari su tijekom listopada 2012. pismeno obaviješteni o rezultatima ostalih seroloških testova.

4.2.1. Distribucija pasa prema kategorijama (namjeni)

Pse smo prema namjeni podijelili u pet skupina:

- a) Psi čuvari - svi psi koji se ne koriste u lovnu, bez obzira na pasminu, a noć provode u boksu ili psećoj kući.
- b) Kućni psi - noć uvijek provode u kući.
- c) Lovački psi - svi psi koji se koriste u lovnu, bez obzira na pasminu, a noć provode u kućici ili boksu.
- d) Ovčarski psi - čitavu prethodnu sezonu aktivnosti papatača proveli su na otvorenom uz stada ovaca.
- e) Službeni psi - čitavu prethodnu sezonu aktivnosti papatača proveli su na otvorenom u dvorištu ili boksu.

Grafikon 1. Udio pretraženih pasa prema kategoriji (namjeni)



Tablica 1. Porijeklo uzoraka po županijama (skupine) i dvorištima, pregled dobi, spola i kategorije

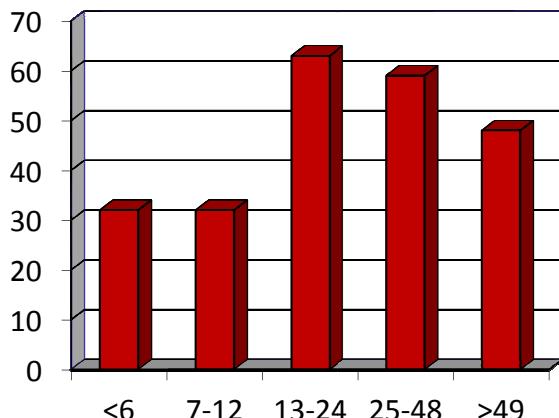
Županija (skupina)	Broj dvorišta	Broj pasa/ projek	Spol / (%)	Dob/mj	N	Kategorija / N
I Zadarska	21	64/(3)	M -35 55%) Ž -29 (45%)	<6	4	
				7-12	3	Čuvar / 12
				13-24	16	Kućni / 1
				25-48	16	Lovački / 51
				>48	17	
				Nepoznata	8	
II Šibensko – kninska	12	43/(3,6)	M -28 65%) Ž -15 (35%)	<6	5	Čuvar / 1
				7-12	1	Lovački / 40
				13-24	10	Ovčarski / 2
				25-48	10	
				>48	17	
				Nepoznata	8	
III Splitsko – dalmatinska	26	135/(5,2)	M -80(59%) Ž -55 (41%)	<6	23	Čuvar / 5
				7-12	28	Lovački / 94
				13-24	37	Ovčarski / 1
				25-48	33	
				>48	14	Službeni / 35
Ukupno	59	242 (4,1)	M -143 (59%) Ž -99 (41%)		242	242

4.2.2. Distribucija pasa prema dobnim skupinama

Pretražene pse podijelili smo u 5 dobnih skupina: <6 mj; 32 psa, 7-12 mj; 32 psa, 13-24 mj; 63 psa, 25-48 mj; 59 pasa i >49 mj; 48 pasa. (Grafikon 2.).

Za 8 pasa iz azila u Benkovcu, nismo imali podatke o starosti.

Grafikon 2. Broj pretraženih pasa u cijelom području pretraživanja prema dobnim skupinama



4.3. Klinička pretraga

Na svim psima obavljena je opća klinička pretraga koja je uključivala pregled vidljivih sluznica, očiju, kože, dlake, potkožnih limfnih čvorova, te vrijednosti trijasa. Uzorci su uzimani isključivo od klinički zdravih pasa, dok klinički sumnjivi nisu bili predmet ovog istraživanja.

4.4. Uzimanje uzorka

Krv je uzimana prema svim mjerilima asepse i antisepse, venepunkcijom *v. cephalica antebrachii*, po 3ml u svaku od dvije epruvete (s EDTA i bez) od svakog psa. Do dostave u Laboratorij za dijagnostiku Veterinarskog zavoda Split, uzorci su bili pohranjeni u prenosivim hladnjacima na temperaturi +4°C. Krvni serumi su po dospijeću u laboratorij odvajani centrifugiranjem na 3000 okretaja / 15 minuta. Nakon odvajanja, krvni serumi i uzorci krvi antikoagulansom (EDTA) pohranjeni su do izvođenja testova u laboratorijskim zamrzivačima na temperaturi -20°C.

4.5. Primjenjene serološke metode

Tri primjenjene serološke metode su komercijalni testovi (imunoenzimni test – ELISA INGENASA, Canine Leishmania Antibody Test Kit, SNAP test IDEXX i Leishmania

Dipstick® RAPYDTEST® DyaSys), izvođeni prema uputstvima proizvođača. Pretraživanja uzoraka izvođena su od rujna do listopada 2012.g. u Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

Metoda neizravne imunofluorescencije je *in house* metoda, modificirana prema MARTINKOVIĆ i MARINCULIĆ, (2006.). Izvođena je je tijekom veljače 2011.g. u Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

4.5.1. Neizravna imunofluorescencija

Princip testa

Metodom neizravne imunofluorescencije (engl. IFAT – Indirect Fluorescent – Antibody Assay) dokazuju se specifična protutijela IgG razreda protiv bičaša *L. infantum* u krvi pasa.

U dokazivanju protutijela u serumu na mikroskopski preparat s poznatim lišmanijskim antigenom najprije se nanese pretraživani serum. Preparat se određeno vrijeme inkubira da bi se eventualno prisutna protutijela vezala na antigen. Zatim se preparat ispere, da se uklone nevezana protutijela, prelije otopinom označenih antiglobulina, inkubira i ponovno ispere. Ako u pretraživanom serumu ima protutijela, na kraju reakcije u preparatu nastaje kompleks antigen-protutijela-označeni antiglobulini, koji fluorescira obasjan ultraljubičastim zrakama u imunofluorescentnom mikroskopu. Ukoliko u pretraživanom serumu nema protutijela za upotrijebljeni antigen, s preparata se ispere pretraživani serum, a također i označeni antiglobulini, pa se u vidnom polju ne vidi fluoresciranje.

Korišten je komercijalni antiserum (konjugat) Serotec - AAI32F AbD-Sheep anti dog IgG koji sadrži označene antiglobuline i to pročišćenu frakciju IgG vezanu na Fluorescin izotiocianat Isomer 1 (FITC).

Antigen (promastigoti *L. infantum*) je pripremljen prema metodi MANCIANTI i sur. (1996.) s modifikacijom prema MARTINKOVIĆ i MARINCULIĆ, (2006.).

Serumi su pretraživani u dvostrukim serijskim razrjeđenjima počevši od 1/40 (cut-off).

Izvođenje testa

1. Pripreme se pozitivni kontrolni serum poznatog titra i negativni kontrolni serum, te radna razrjeđenja ispitivanih seruma počevši od 1/40. Na svakoj predmetnici jedno polje služi za kontrolu konjugata, na način da se na to polje nanese 10 μ l PBS-a.
2. Nanosi se po 10 μ l radnog razrjeđenja ispitivanih i kontrolnih seruma u polja na predmetnicama s antigenom.
3. Predmetnice se inkubiraju u vlažnoj komori na $37^\circ \pm 2^\circ$ C /30 min.
4. Ispiranje predmetnica uranjanjem dvokratno po 5 min u PBS, potom se kratkotrajno urone u destiliranu vodu i ocijede.
5. Sušenje na zraku.
6. Konjugat se priprema razrjeđivanjem s PBS-om u omjeru 1/100 (prema uputstvu proizvođača) s dodatkom 1% Evansovog modrila.
7. Na svako polje predmetnice nanosi se po 10 μ l prethodno pripremljenog konjugata
8. Predmetnice se inkubiraju u vlažnoj komori na 37° C $\pm 2^\circ$ C /30 min.
9. Ispiranje predmetnica uranjanjem dvokratno po 5 min u PBS, potom se kratkotrajno urone u destiliranu vodu i ocijede.
10. Sušenje na zraku.
11. Na predmetnice se nanosi imerzijsko sredstvo (nekoliko kapi Fluoprepa na svaku predmetnicu) i prekriju pokrovnim stakalcem.
12. Pregled fluorescentnim mikroskopom (povećanje 400x).
13. Očitavanje testa

Prije očitavanja rezultata treba provjeriti da kontrola konjugata (PBS) ne pokazuje nikakve znakove fluorescencije. Ukoliko kontrola pokazuje fluorescenciju, rezultati nisu valjni a test treba ponoviti.

Negativna reakcija: Promastigoti su obojeni crveno, narančasto crveno ili tamno zeleno. Nema uočljivog fluoresciranja membrana.

Pozitivna reakcija: Promastigoti manje ili više fluoresciraju, citoplazma im je svijetlo zelena, fluoresciranje membrane i bičeva čini ih jasno vidljivima.

4.5.2 Imunoenzimni test (ELISA) INGENASA LEISHMANIA Indirect ELISA ING 15. LSH. K1.

Princip testa:

Dijagnostički komplet se temelji na indirektnom imunoenzimnom testu (ELISA); antigen je pričvršćen na dnu jažica polistirenske ploče. Ukoliko ispitivani serum sadrži specifična protutijela, ona će se vezati na antigen. Nakon ispiranja odstrane se sve nevezane tvari iz seruma. Prisutnost specifičnih protutijela u ispitivanom serumu dokazuje se specifičnim konjugatom koji se sastoji od psećih antiimmunoglobulina obilježenih enzimom peroksidazom. Nakon unošenja substrata u jažice dolazi do razvoja kolorimetrijske reakcije koja se mjeri spektrofotometrom. Pojava obojenja znači prisustvo, a izostanak odsustvo antilišmanijskih protutijela u ispitivanom serumu.

Izvođenje testa (prema uputstvu proizvođača):

1. Dijagnostički komplet i ispitivani serumi prije izvođenja testa moraju postići sobnu temperaturu
2. Reagensi i serumi lagano se protresu prije upotrebe
3. Pripremiti otopinu za ispiranje (concentrated washing solution); 1 dio solucije i 9 dijelova destilirane vode
4. Pozitivni i negativni kontrolni serumi unose se jažice polistirenske pločice bez prethodnog razrjeđivanja (ready to use). Ispitivani serumi razrjede se u posebnoj mikrotitracijskoj plitici 1/100 u diluentu. (npr. 2 µl seruma + 198 µl diluenta).
5. U jažice (A1 i A2) unose se pozitivni, a u jažice (B1 B2) negativni kontrolni serumi u količini od 100µl. U preostale jažice unosi se po 100µl razrjeđenih ispitivanih seruma.
6. Polistirenska pločica prekrije se zaštitnom folijom i inkubira 10 min. na sobnoj temperaturi (18-25 °C).
7. Sadržaj pločice isprazni se naglim okretanjem.
8. Pločice se ispiru s razrijeđenom otopinom (Washing solution) pripremljenom pod točkom 3, najmanje 4 puta uz tapkanje pliticom na filter papir da bi se jažice u cijelosti ispraznile. Washing solution se dodaje u količini 300 µl za svaku jažicu.

9. Konjugat se priprema neposredno prije upotrebe razrjeđivanjem u diluentu 1/100, i unosi u svaku jažicu u količini 100 µl.
10. Pločica se inkubira 10 min. na sobnoj temperaturi (18-25 °C).
11. Sadržaj pločice isprazni se naglim okretanjem.
12. Pločice se ispiru s razrijeđenom otopinom (Washing solution) pripremljenom pod točkom 3, najmanje 4 puta uz tapkanje pliticom na filter papir da bi se jažice u cijelosti ispraznile. Washing solution se dodaje u količini 300 µl za svaku jažicu.
13. U svaku jažicu dodaje se 100µl substrate solution te se pločica ostavi 5 minuta na sobnoj temperaturi.
14. U svaku jažicu dodaje 100µl Stop solution radi zaustavljanja reakcije.
15. Apsorbancije se očitavaju u imunoenzimnom čitaču (spektrofotometru) pri 450 nm.

Validacija testa:

Srednja vrijednost pozitivne kontrole se dobije zbrajanjem dvije očitane vrijednosti optičkih gustoća i dijeljenjem s 2, na isti način dobijemo i srednju vrijednost negativne kontrole.

Izračunavanje cut-off vrijednosti i tumačenje rezultata:

Pozitivni cut off: OG pozitivne kontrole x 0,35.

Negativni cut off: OG pozitivne kontrole x 0,30.

Očitavanje rezultata:

Pozitivan uzorak seruma: Serum s OG višom od vrijednosti pozitivnog cut off-a.

Negativan uzorak seruma: Serum s OG nižom od vrijednosti negativnog cut off-a.

Sumnjivi su uzorci oni kojima je vrijednost OG između dva cut off-a.

Test je valjan ukoliko:

Srednja vrijednost OG pozitivne kontrole je $\geq 0,8$

Srednja vrijednost OG negativne kontrole je $<$ negativnog Cut off –a

4.5.3. Canine Leishmania Antibody Test Kit SNAP ® - IDEXX

Princip testa:

Canine Leishmania Antibody Test Kit je imunoenzimni test za detekciju protutijela na *L.donovani* i *L. infantum* u uzorcima pune krvi, seruma ili plazme pasa. U kitu se koristi pročišćeni lišmanijski antigen.

Konjugat se pomiješa s testiranim uzorkom i nanosi na SNAP tester koji se tada aktivira i otpušta uklopljene reagense. Pojava kolorimetrijske reakcije razmjerna je koncentraciji specifičnih antilišmanijskih protutijela u pretraživanom uzorku. Pojava obojenja pozitivne kontrolne točke dokaz je valjanosti reagensa i same reakcije. Pojava obojenja negativne kontrolne točke ukazuje na nespecifičnu reakciju ili nepravilno izvođenje testa.

Izvođenje testa (prema uputstvu proizvođača):

1. Pipetom ukapati 2 kapi uzorka (puna krv, serum ili plazma) u epruveticu.
2. Ukapati 6 kapi konjugata u epruveticu, te je držati okomito.
3. Zatvoriti epruveticu i izmiješati sadržaj okrećući je 3 do 5 puta.
4. Tester staviti na ravnu površinu i sadržaj epruvetice pažljivo uliti u jažicu za uzorak.
Uzorak krvi će za 30 do 60 sekunda preko prozora rezultata doći do aktivacijskog kruga.
4. Čim se uoči promjena boje aktivacijskog kruga, potrebno je snažno pritisnuti tester.
U slučaju da uzorak krvi ne dospije do aktivacijskog kruga za 60 sekunda, pritisnuti tester nakon što je krv prešla preko prozora rezultata.
6. Rezultati se očitavaju 6 minuta od trenutka aktivacije testera.

Pozitivna kontrola se može pojaviti prije, ali rezultat je konačan tek nakon 6 minuta.

Očitavanje rezultata:

Rezultati testa se očitavaju u prozoru rezultata.

Pozitivan rezultat: Pojava boje u točci ispitivanog uzorka ukazuje na prisutnost protutijela protiv bičaša *Leishmania* spp.

Negativan rezultat: Pojava obojenja samo u pozitivnoj kontrolnoj točci.

Reakcije u negativnoj kontrolnoj točci:

Negativna kontrolna točka služi kao osiguranje od lažno pozitivnih reakcija i indikator pravilnog izvođenja testa.

Rezultat je pozitivan ukoliko je boja u točci ispitivanog uzorka tamnija od boje negativne kontrolne točke.

Test nije valjan ukoliko je boja negativne kontrolne točke jednako tamna ili tamnija od boje u točci ispitivanog uzorka.

4.5.4. Leishmania Dipstick® RAPYDTEST® DyaSys

Princip testa:

DyaSys Leishmania One Step test je kvalitativni imunokromatografski test za otkrivanje specifičnih protutijela za lišmanije u serumu ili plazmi. Membrana testnog štapića (dipstick) je na mjestu testne linije presvučena rekombinantnim lišmanijskim antigenom - rK39 (ponavljujući imunodominantni epitop amastigota *L. infantum*, *L. chagasi* i *L. donovani*), a na mjestu kontrolne linije s protutijelima za protein A.

Tijekom testiranja ispitivani uzorak krvnog seruma reagira s obojenim konjugatom (protein A - koloidno zlato) kojim je prethodno obložen testni štapić.

Nastala mješavina migrira kapilarnom silom prema gore na kromatografsku membranu kako bi reagirala s rekombinantnim lišmanijskim antigenom na membrani, prilikom čega nastaje crvena linija. Pojava crvene linije znači pozitivan rezultat, dok njen izostanak znači negativan rezultat.

Bez obzira na prisutnost protutijela, mješavina se nastavlja širiti preko membrane sve do pričvršćenog anti – proteina A, pa se i na kontrolnom mjestu pojavi crvena linija.

Prisutnost ove crvene linije služi kao provjera dostatnosti volumena uzorka, pravilnog tijeka mješavine i kao kontrola reagensa.

Izvođenje testa (prema uputstvu proizvođača):

Prije izvođenja testa ispitivani serumi i puferirana otopina konjugata (Chase Buffer) moraju postići sobnu temperaturu.

Izvaditi testni štapić iz zaštitne vrećice.

Dodati 20 µl ispitivanog seruma na dio testnog štapića ispod oznake strelice.

Staviti testni štapić u testnu tubu ili jažicu pločice za uzgoj tkivnih kultura na način da je kraj štapića usmjeren prema dolje kako to pokazuje smjer strelica.

Dodati 2-3 kapi (150 µl) i puferirane otopine konjugata koja se isporučuje s testnim kompletom.

Očitati rezultat nakon 10 minuta. Važno je da pozadina bude čista prije očitavanja testa, posebno kada se radi o serumima s niskom razinom protutijela, pa se na testnom mjestu (T) pojavi slaba linija.

Rezultati očitani nakon isteka propisanog vremena očitavanja mogu biti pogrešni.

Očitavanje rezultata:

Pozitivan rezultat

Test je pozitivan ukoliko se na testnom mjestu pojave kontrolna linija i testna linija.

Pozitivan rezultat ukazuje na prisutnost protutijela za pripadnike kompleksa *L. donovani* u pretraživanom serumu.

Blijeda linija smatra se pozitivnim rezultatom. Kao vodič za tumačenje, crvena boja na testnom području varirati će ovisno o koncentraciji prisutnih antilišmanijskih protutijela.

Testna linija kod „slabo pozitivnih“ seruma može varirati od slabo pozitivne crvene do bijedo crvene na gotovo bijeloj pozadini.

Negativan rezultat

Test je negativan ukoliko se pojavi samo kontrolna linija. Testna linija nije prisutna. Negativan rezultat znači da Leishmania dipstick test u pretraživanom serumu nije otkrio protutijela za pripadnike kompleksa *L. donovani*.

Nevažeći test

Test nije valjan ukoliko se ne pojavi niti kontrolna niti testna linija. Test također nije valjan ukoliko nema kontrolne linije, a testna linija se pojavi. U takvim slučajevima test treba ponoviti upotrebom novog testnog štapića i svježeg uzorka seruma.

4.6. Molekularne metode

Molekularne metode izvođene su u laboratorijima Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, od veljače do travnja 2013. godine.

4.6.1. Izolacija DNK iz krvi

Izdvajanje DNK iz 200 µl krvi sa EDTA učinjeno je pomoću komercijalnog kita DNAeasy Blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputama proizvođača uz korištenje automatskog sustava za izdvajanje DNK; QIACUBE (Qiagen, Hilden, Germany). Kit omogućava kvalitetno izdvajanje DNK iz krvi i različitih tkiva, a ujedno i iz patogenih organizama koji mogu biti prisutni u uzorku. Ovako izdvojena DNK je najpogodnija za daljnje postupke analize. Za kontrolu kvalitete izdvajanja DNK, odnosno kontrolu moguće kontaminacije uzoraka koristili smo destiliranu vodu u svakom dvanaestom uzorku, odnosno po jednom ciklusu automatskog izdvajanja DNK. Nakon završetka automatske izolacije dobiveno je 200 µl izdvojene DNK koja će biti korištena u analizi PCR-om.

4.6.2. Lančane reakcije polimerazom

Lančana reakcija polimerazom je korištena kako bi se umnožili ciljani odsječci pojedinih gena. Za dokazivanje DNK uzočnika (*L. infantum*) korištena su tri različita protokola (FISA i sur., 2001.; LE FICHOUX i sur., 1999, SCHÖNIAN i sur., 2003.). Lančana reakcija polimerazom korištena je kako bi se umnožili ciljani odsječci kinetoplastne DNK (LE FICHOUX i sur., 1999.) veličine 145 parova baza (engl. base pairs, bp), ponavljajuće sekvene DNK unutar genoma *L. infantum* (FISA i sur., 2001.) veličine 100 parova baza te unutarnja prepisujuća razmagnica (internal transcribed spacer, ITS) (SCHÖNIAN i sur., 2003.) veličine 300 parova baza.

U svakoj reakciji korištene su specifične uzvodne i nizvodne početnice, „radna mješavina“ Emerald (Takara), voda slobodna od RNK/DNK-aza i ranije izdvojena DNK.

Ukupan volumen po PCR reakciji bio je 50 µl, a sastojala se od 25 µl „radne mješavine“, po 1 µl svake specifične početnice, 18 µl vode te 5 µl DNK.

Reakcije su se odvijale u toplokružnicima (aparat za termocikliranje ili engl. termocycler) Veriti, 2720 i 9700 (Applied Byosystems). Pri umnažanju ciljanih uzročnika korištene su pozitivne i negativne kontrole.

Primjenjeni su slijedeći protokoli:

4.6.2.1 Kinetoplastna DNK

Za dokazivanje kinetoplastne DNK korišten je protokol umnažanja prema LE FICHOUX i sur. (1999.) kojim se umnaža ciljani odsječak od 145 parova baza korištenjem prednje početnice RV1 5'- CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG -3' i stražnje početnice RV2 5'- CCACCTGGCCTATTTACACCA -3'

Reakcija se sastojala od inicijalne 15 minutne denaturacije, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa kako slijedi:

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C tijekom 45 s;
2. prihvatanje početnica pri temperaturi od 62°C tijekom 45 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C tijekom 30 s.

Nakon posljednjeg ciklusa, produženje je provedeno na 72°C tijekom sedam minuta.

Reakcija je automatski zaustavljena pri temperaturi od 4°C.

4.6.2.2. Unutarnja prepisujuća razmagnica

Za dokazivanje unutarnje prepisujuće razmagnice 1 (*internal transcribed spacer 1*, ITS-1) korišten je protokol umnažanja prema SCHÖNIAN i sur. (2003.) kojim se umnaža ciljani odsječak od oko 300 parova baza korištenjem prednje početnice:

LITSR 5'- CTGGATCATTTCGATG-3'

i stražnje početnice:

L5.8S 5'-TGATACCACTTATCGCACTT -3'

Reakcija se sastojala od inicijalne 15-o minutne denaturacije, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa kako slijedi:

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C tijekom 45 s;
2. prihvatanje početnica pri temperaturi od 53°C tijekom 30 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C tijekom 30 s.

Nakon posljednjeg ciklusa, produženje je provedeno na 72°C tijekom sedam minuta. Reakcija je automatski zaustavljena pri temperaturi od 4°C.

4.6.2.3. Ponavljače sekvene DNK

Za dokazivanje ponavljače sekvene DNK unutar genoma *L. infantum* korišten je ugniježđeni protokol (nested PCR) umnažanja prema FISA i sur. (2001) kojim se umnaža ciljni odsječak od 100 parova baza korištenjem prednje početnice EXT 5'-AATTCGACGATCACGAGGTC -3' i stražnje početnice E2B 5'-CGACTCGGTTGGCACACTGC -3' u prvoj reakciji. Za drugu, ugniježđenu reakciju korišteno je 45 µl mješavine i 5µl PCR proizvoda iz prve reakcije, koji je služio kao predložak za drugu PCR reakciju. Mješavina je pripremljena na isti način kao i u prvoj reakciji, s razlikom što su korištene nove početnice P1 5'-ACG AGG TCA GCT CCA CTC C-3' i 5'-CTG CAA CGC CTGTGT CTA C -3', te smanjena količina vode.

Za sigurnost i kontrolu moguće kontaminacije korištene su dvije negativne kontrole i jedna pozitivna kontrola. Prva negativna kontrola je predstavljala 5 µl predloška negativne kontrole iz prve reakcije, dok je druga predstavljala 5 µl vode. Za pozitivnu kontrolu korišteno je 5µl pozitivne kontrole iz prve reakcije.

Prva i druga reakcija se sastojala od inicijalne 15-o minutne denaturacije, nakon čega je uslijedilo 35 ciklusa kako slijedi:

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C tijekom 45 s;
2. prihvaćanje početnica pri temperaturi od 59°C tijekom 30 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C tijekom 30 s.

Nakon posljednjeg ciklusa, produženje je provedeno na 72°C tijekom sedam minuta.

Reakcija je automatski zaustavljena pri temperaturi od 4°C.

Uspješnost umnožavanja provjerena je kapilarnom elektroforezom QIAEXCEL-om (Qiagen, Hilden, Germany) uz korištenje kita za provjeru (Qiagen, Hilden, Germany).

4.7. Statistička analiza

Statistička obrada podataka obavljena je programom Stata 10.0 (Stata corp. SAD). Za usporedbu dobi pasa prema podrijetlu korišten je neparametrijski Kruskall Wallis. Univarijantnom analizom pomoću χ^2 test i Fisher exact testa provjerena je povezanost rezultata testa s pojedinačnim čimbenicima rizika, a statistička povezanost prikazana je p-vrijednostima. Multivarijantna analiza obavljena je pomoću logističke regresije pri čemu su u model uvršteni čimbenici koji su bili značajno povezani s ishodom testova. Rezultati logističke regresije prikazani su omjerima vjerojatnosti (engl. *odds ratio*).

Rezultati pojedinih testova međusobno su uspoređeni Kappa testom, a stupanj njihove međusobne podudarnosti prikazan je Kappa indeksom.

5. REZULTATI

5.1. Rezultati obavljenih pretraga po županijama i mjestima

U cijelom pretraživanom području, primjenom različitih seroloških i molekularnih (PCR) metoda ukupno su pretražena 242 psa. U svakoj od tri skupine (županije) su detektirani pozitivni psi. Trideset i četiri uzorka (14%) su dala pozitivan rezultat najmanje jednom od ukupno sedam primijenjenih seroloških ili molekularnih metoda.

Trideset uzoraka bilo je pozitivno najmanje jednom serološkom, dok je dvadeset i jedan uzorak bio pozitivan najmanje jednom molekularnom metodom.

Sedamnaest uzoraka istodobno je bilo pozitivno najmanje jednom serološkom i jednom molekularnom metodom.

Zbirni rezultati svih obavljenih pretraga prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2: Zbirni rezultati obavljenih pretraga po županijama i mjestima

Županija (Skupina)	Mjesto	Ukupan broj pretraženih pasa	Serološke pretrage		Molekularne pretrage		Pozitivno i serološkim i molekularnim pretragama / %	
			Pozitivno	%	Pozitivno	%		
Zadarska (I)	Benkovac	12	4	33,3	3	25	3	25
	Biograd n/M	28	2	7,1	1	3,5	1	3,5
	Lišane Ostrovičke	5	0	0	0	0	0	0
	Perušić Benkovački	2	0	0	0	0	0	0
	Podgrađe	2	0	0	0	0	0	0
	Vrana	15	2	13,3	2	13,3	1	6,7
	UKUPNO	64	8	12,5	6	9,4	5	7,8
Šibensko – kninska (II)	Knin	15	5	33,3	3	20	2	13,3
	Potkonje	4	1	25	1	25	1	25
	Vrpolje	24	6	25	5	20,8	3	12,5
	UKUPNO	43	12	27,9	9	20,9	6	14
Splitsko – dalmatinska (III)	Brnaze	24	3	12,5	1	4,2	1	4,2
	Cetina	5	1	20	0	0	0	0
	Glavice	3	0	0	0	0	0	0
	Ježević	16	2	12,5	2	12,5	2	12,5
	Kosore	11	0	0	0	0	0	0
	Lučane	27	1	3,7	1	3,7	1	3,7
	Podosije	2	0	0	0	0	0	0
	Sinj	5	3	60	2	40	2	40
	Trilj	40	0	0	0	0	0	0
	Vrlika	2	0	0	0	0	0	0
	UKUPNO	135	10	7,4	6	4,4	6	4,4
Ukupno za cijelo pretraženo područje Σ		242	30	12,4	21	8,7	17	7

5.1.1. Skupina I - Zadarska županija

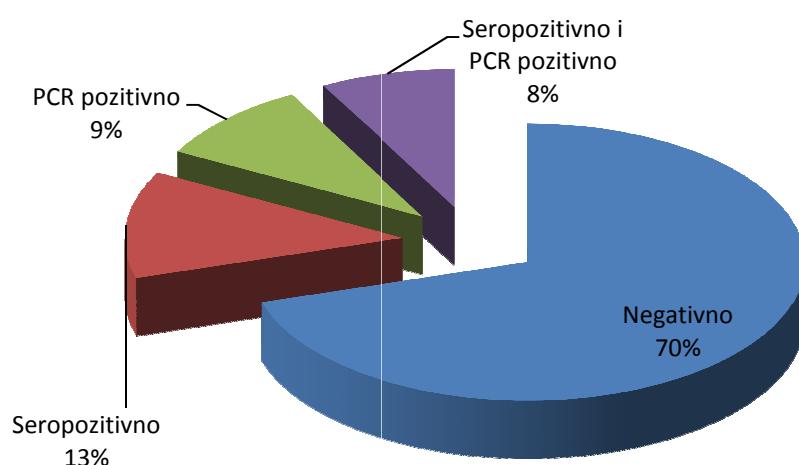
U Zadarskoj županiji su u istraživanje uključena 64 psa porijeklom iz 6 gradova i sela (mjesta). Serološki pozitivno bilo je 8 pasa (12,5 %), a serološki negativno 56 pasa (87,5%). Serološki pozitivni psi zatečeni su u 4 od 21 pretraženog dvorišta (19%).

Molekularnim metodama (PCR) pozitivno je bilo 6 pasa (9,4 %), a negativno 58 pasa (90,6%) Psi pozitivni molekularnim metodama (PCR) zatečeni su u 4 od 21 pretraženog dvorišta (19%).

Serološkim i molekularnim metodama (PCR) istodobno, pozitivno je bilo 5 (7,8 %), a negativno 59 pasa (92,2%).

Rezultati svih pretraga u Zadarskoj županiji prikazani su u Grafikonu 3. i Tablici 3.

Grafikon 3. Zadarska županija - relativni odnos negativnih, serološki i molekularno pozitivnih pasa



Tablica 3. Skupina I - Zadarska županija-zbirni rezultati pretraga

Mjesto	Zadarska županija (Skupina I)		Serološke pretrage		PCR pretrage		Serološke i PCR pretrage	
	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dvorišta (%)	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dvorišta (%)	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dvorišta (%)		
Benkovac	4/12 (33,3)	1/2 (50)	3/12 (25)	1/2 (50)	3/12 (25)	1/2 (50)		
Biograd n/M	2/28 (7,1)	1/5 (20)	1/28 (3,6)	1/5 (20)	1/28 (3,6)	1/5 (20)		
Lišane Ostrovičke	0/5 (0)	0/3 (0)	0/5 (0)	0/3 (0)	0/5 (0)	0/3 (0)		
Perušić Benkovački	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)		
Podgrađe	0/2 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/1 (0)		
Vrana	2/15 (13,3)	2/8 (25)	2/15 (13,3)	2/8 (25)	1/15 (6,7)	1/8 (12,5)		
Σ (%)	8/64 (12,5)	4/21 (19)	6/64 (9,4)	4/21 (19)	5/64 (7,8)	3/21 (14,3)		

5.1.2. Skupina II - Šibensko-kninska županija

U Šibensko-kninskoj županiji je u istraživanje uključeno 43 psa porijeklom iz 3 grada i sela (mjesta). Serološki pozitivno bilo je 12 pasa (27,9 %), a serološki negativan 31 pas (72,1%). Serološki pozitivni psi zatečeni su u 9 od 12 pretraženih dvorišta (75%).

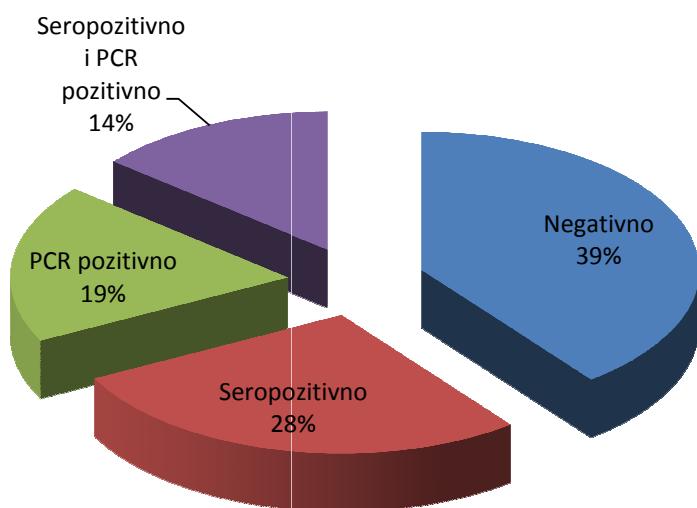
Molekularnim metodama (PCR) pozitivno je bilo 9 pasa (21 %), a negativno 34 psa (79 %). Pozitivni psi zatečeni su u 7 od 12 pretraženih dvorišta (58,3%).

Serološkim i molekularnim metodama (PCR) istodobno, pozitivno je bilo 6 (14%), a negativno 37 pasa (86%).

Pozitivni psi zatečeni su u 6 od 12 pretraženih dvorišta (50%).

Zbirni rezultati pretraga u Šibensko-kninskoj županiji prikazani su u Grafikonu 4. i Tablici 4.

Grafikon 4. Šibensko-kninska županija - relativni odnos negativnih, serološki i molekularno pozitivnih pasa



Tablica 4. Skupina II - Šibensko-kninska županija – zbirni rezultati pretraga

Mjesto	Šibensko-kninska županija (SkupinaII)		Serološke pretrage		PCR pretrage		Serološke i PCR pretrage	
	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dvorišta (%)	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dvorišta (%)	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dvorišta (%)		
Knin	5/15 (33,3)	4/5 (80)	3/15 (20)	3/5 (60)	2/15 (13,3)	2/5 (40)		
Potkonje	1/4 (25)	1/2 (50)	1/4 (25)	0/2 (0)	1/4 (25)	1/2 (50)		
Vrpolje	6/24 (25)	4/5 (80)	5/24 (21)	4/5 (80)	3/24 (12,5)	3/5 (60)		
Σ (%)	12/43 (27,9)	9/12 (75)	9/43 (21)	7/12 (58,3)	6/43 (14)	6/12 (50)		

5.1.3. Skupina III - Splitsko-dalmatinska županija

U Splitsko-dalmatinskoj županiji istraživanjem je obuhvaćeno 135 pasa porijeklom iz 10 gradova i sela (mjesta). Serološki pozitivno bilo je 10 pasa (7,4 %), a serološki negativno 125 pasa (92,6%). Serološki pozitivni psi zatečeni su u 9 od 26 pretraženih dvorišta (34,6%)

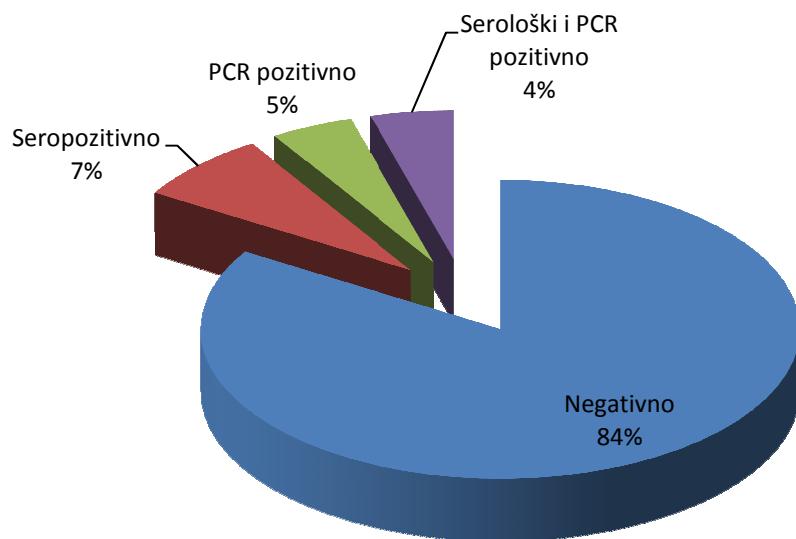
Molekularnim metodama (PCR) pozitivno je bilo 6 pasa (4,4 %), a negativno 129 pasa (95,6 %). Pozitivni psi zatečeni su u 6 od 26 pretraženih dvorišta (23 %).

Serološkim i molekularnim metodama (PCR) istodobno, pozitivno je bilo 6 (4,4 %), a negativno 129 pasa (95,6 %).

Pozitivni psi zatečeni su u 6 od 26 pretraženih dvorišta (23 %).

Zbirni rezultati pretraga u Splitsko-dalmatinskoj županiji prikazani su u Grafikonu 5. i Tablici 5.

Grafikon 5. Splitsko-dalmatinska županija - relativni odnos negativnih, serološki i molekularnim metodama (PCR) pozitivnih pasa



Tablica 5. Splitsko-dalmatinska županija - zbirni rezultati pretraga

Mjesto	Serološke pretrage		PCR pretrage		Serološke i PCR pretrage	
	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dvorišta (%)	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dvorišta (%)	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dvorišta (%)
Brnaze	3/24 (12,5)	2/4 (50)	1/24 (4,2)	1/4 (25)	1/24 (4,2)	1/4 (25)
Cetina	1/5 (20)	1/1 (100)	0/5 (0)	0/1 (0)	0/5 (0)	0/1 (0)
Glavice	0/3 (0)	0/1 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)	0/3 (0)	0/1 (0)
Ježević	2/16 (12,5)	2/5 (40)	2/16 (12,5)	2/5 (40)	2/16 (12,5)	2/5 (40)
Kosore	0/11 (0)	0/3 (0)	0/11 (0)	0/3 (0)	0/11 (0)	0/3 (0)
Lučane	1/27 (3,7)	1/5 (20)	1/27 (3,7)	1/5 (20)	1/27 (3,7)	1/5 (20)
Podosoje	0/2 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/1 (0)
Sinj	3/5 (60)	3/3 (100)	2/5 (40)	2/3 (66,7)	2/5 (40)	2/3 (66,7)
Trilj	0/40 (0)	0/2 (0)	0/40 (0)	0/2 (0)	0/40 (0)	0/2 (0)
Vrlika	0/2 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/1 (0)
Σ (%)	10/135 (7,4)	9/26 (34,6)	6/135 (4,4)	6/26 (23)	6/135 (4,4)	6/26 (23)

5.1.4. Zbirni rezultati po županijama

Na cijelom području pretraživanja serološki je bilo pozitivno 30 pasa (12,4 %), a serološki negativno 212 pasa (87,6%). Molekularnim metodama (PCR) pozitivan je bio 21 (8,7 %), a negativan 221 pas (91,3 %). Istodobno je serološkim i molekularnim metodama (PCR) pozitivno bilo 17 (7 %), a negativno 225 pasa (93 %) (Tablica 6.).

Tablica 6. Rezultati po županijama – broj pozitivnih pasa serološkim i molekularnim metodama i udio pozitivnih dvorišta

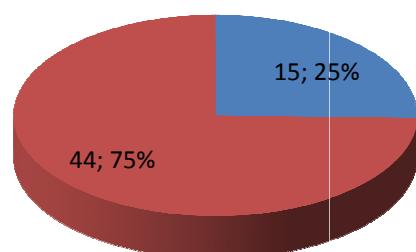
ŽUPANIJA (Skupina)	Pozitivni psi/ukupno pretraženi psi (%)	Pozitivna dvorišta/pretražena dвориšта (%)
Zadarska (I)	5/64 (7,8)	3/21 (14,3)
Šibensko-kninska (II)	6/43 (13,9)	6/12 (50)
Splitsko-dalmatinska (III)	6/135 (4,4)	6/26 (23)
Σ (%)	17/242 (7,0)	15/59 (25,4)

Na cijelom području pretraživanja psi su bili zatečeni na 59 lokacija, odnosno dvorišta, od kojih su u 15 psi bili istodobno pozitivni serološkim i molekularnim metodama (PCR). Odnos serološkim i molekularnim metodama pozitivnih i negativnih dvorišta (brojčana vrijednost i postotak) prikazani su u Grafikonu 6. i Tablici 7.

5.2. Rezultati prema broju pasa u dvorištima

Grafikon 6. Odnos pozitivnih i negativnih dvorišta

- Pozitivno serološkim i molekularnim metodama
- Negativno serološkim i molekularnim metodama



Tablica 7. Rezultati u dvorištima s obzirom na broj pasa

Broj pasa u dvorištu	Broj dvorišta	Seropozitivno		PCR pozitivno		Serološki i PCR pozitivno	
		Pasa	Dvorišta	Pasa	Dvorišta	Pasa	Dvorišta
1	17	5	5	2	2	2	2
2	11	3	3	2	2	2	2
3	7	2	2	2	2	1	1
4	10	7	5	5	5	5	5
5	3	2	2	1	1	0	0
6	4	1	1	1	1	1	1
7	1	0	0	1	1	0	0
11	1	4	1	3	1	3	1
12	2	4	2	3	2	2	2
13	2	2	1	1	1	1	1
35	1	0	0	0	0	0	0
Σ	59	30	22	21	18	17	15

Za svako mjesto obuhvaćeno uzorkovanjem, osim broja pretraženih te serološkim i molekularnim metodama (PCR) pozitivnih pasa, zabilježen je i broj dvorišta u kojima su psi zatečeni. Dvorišta u kojima je zatečen jedan ili više serološki /molekularno pozitivnih pasa su zabilježena kao „pozitivna“, a ona u kojima nije bilo serološki /molekularno pozitivnih pasa kao „negativna“. Serološki pozitivnima smatrali smo pse koji su barem jednom od primijenjenih seroloških metoda dali pozitivan rezultat.

Molekularnim metodama (PCR) pozitivnima smatrali smo pse koji su barem jednom od primijenjenih molekularnih metoda dali pozitivan rezultat.

Pretraživanjem u 3 županije obuhvaćeno je 59 dvorišta s ukupno 242 psa.

U 17 dvorišta zatečen je samo po 1 pas. U 12 od tih dvorišta nije utvrđena seropozitivnost.

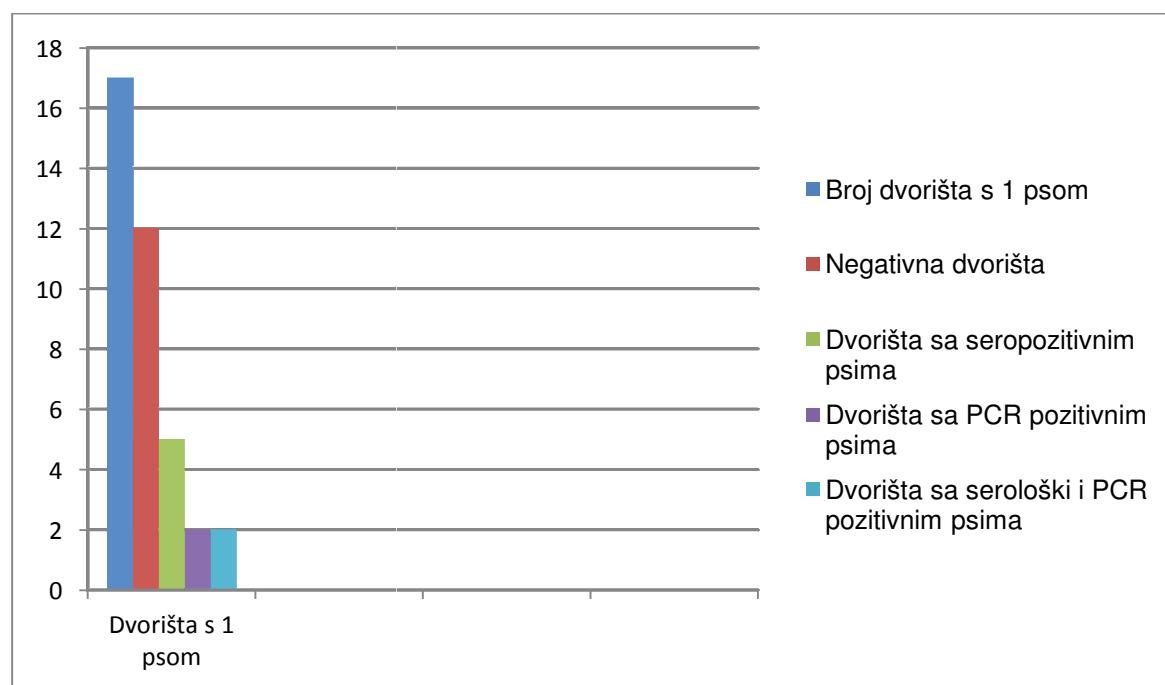
U preostalih 5 dvorišta seropozitivno je bilo 5 pasa, od kojih 3 samo jednom metodom (ELISA).

Dva psa u 2 dvorišta bila su istodobno serološki i PCR pozitivna.

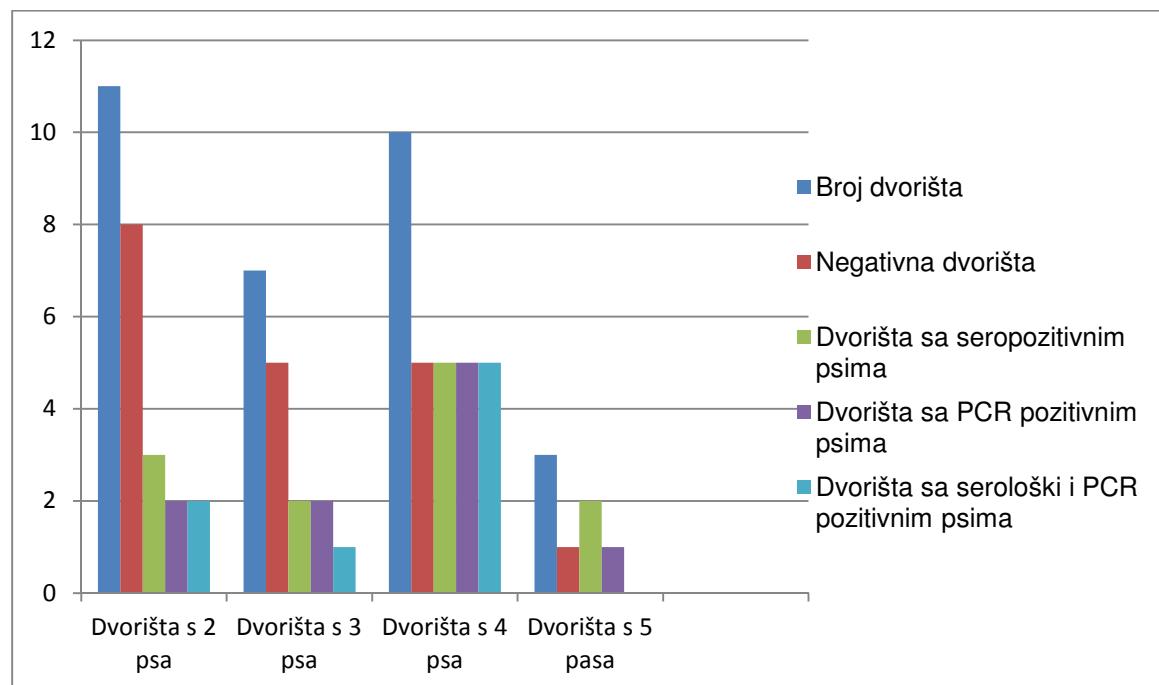
Od 42 dvorišta u kojima je zatečeno 2 i više pasa, u 25 nije zabilježena seropozitivnost.

U preostalih 17 dvorišta je seropozitivno bilo 25 pasa, od kojih je 8 bilo pozitivno samo jednom metodom (7 primjenom ELISA testa i 1 primjenom SNAP test IDEXX). Preostalih 17 pasa bilo je seropozitivno primjenom 2 ili više metoda. U 13 dvorišta s 2 i više pasa otkriveno je 15 pasa pozitivnih serološki i molekularnim (PCR) metodama (prosječno 1,15 pasa po dvorištu).

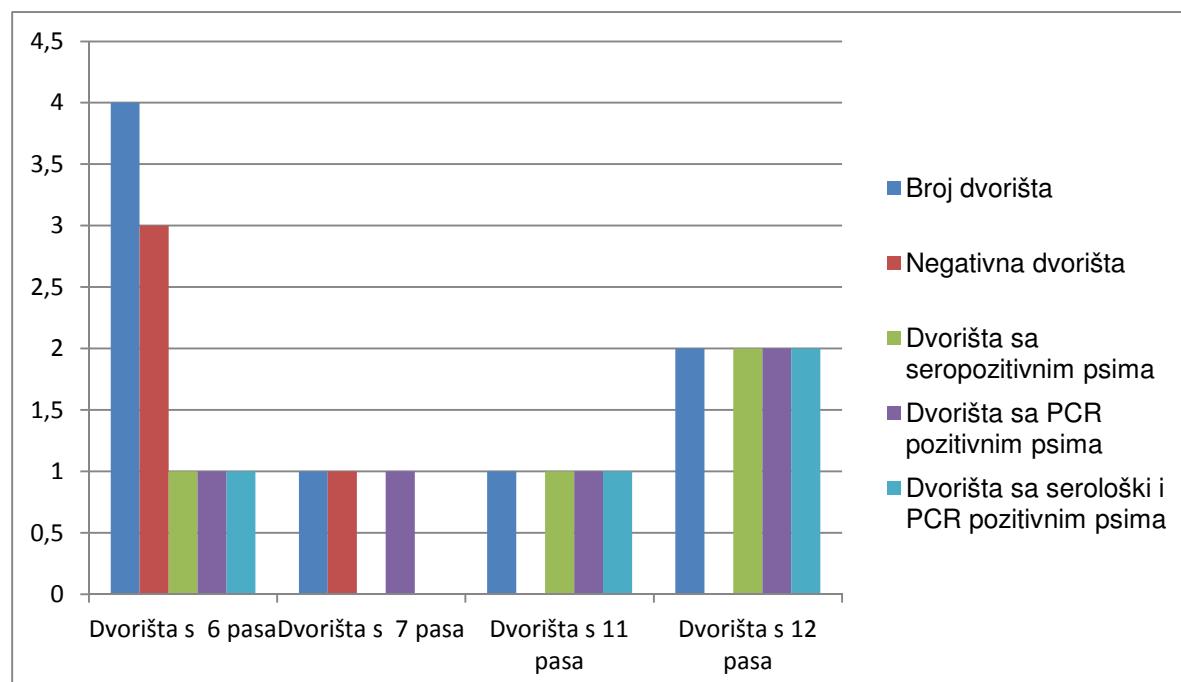
Grafikon 7. Grafički prikaz stanja u dvorištima u kojima je zatečen i pretražen 1 pas



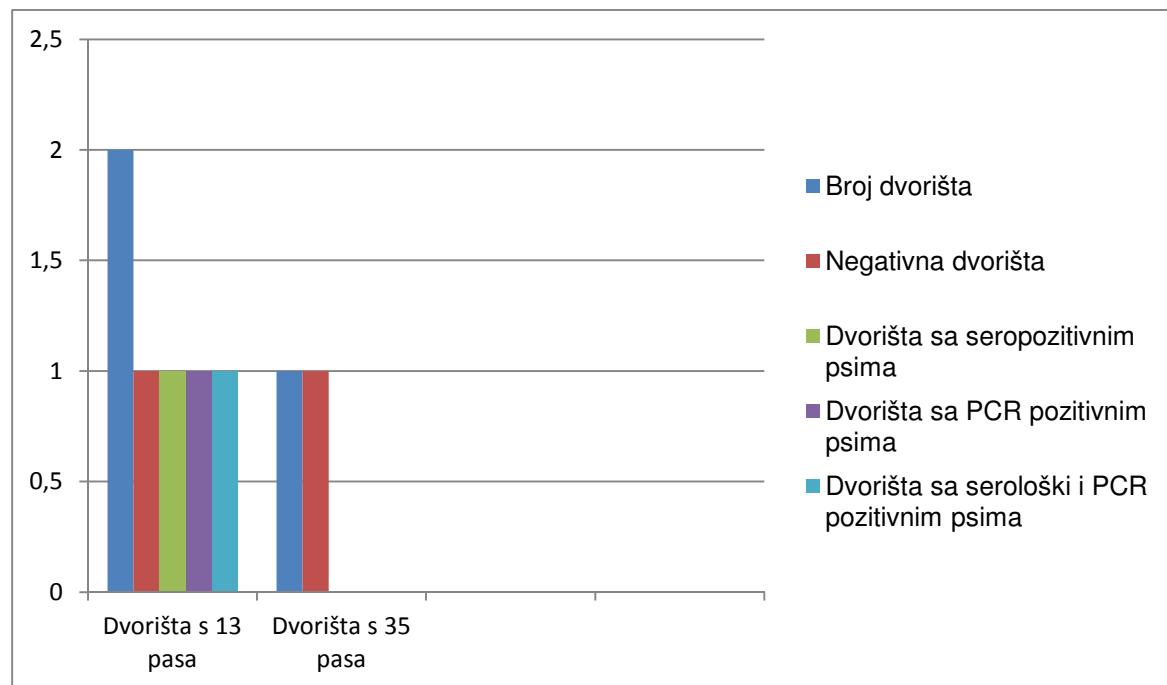
Grafikon 8. Grafički prikaz stanja u dvorištima u kojima je zatečeno i pretraženo 2-5 pasa.



Grafikon 9. Grafički prikaz stanja u dvorištima u kojima je zatečeno i pretraženo 6, 7, 11 i 12 pasa.



Grafikon 10. Grafički prikaz stanja u dvorištima u kojima je zatečeno i pretraženo 13 i 35 pasa.



5.2.1. Udio seropozitivnih pasa u pozitivnim dvorištima.

U cijelom području pretraživanja otkriveno je 30 seropozitivnih pasa u 22 dvorišta. Ukupno se u predmetnim dvorištima nalazio i pretraživanjem obuhvaćen 101 pas.

Udio pasa pozitivnih serološkim metodama u ukupnom broju pasa u pozitivnim dvorištima prikazan je po županijama u tablicama 8, 9 i 10 i grafikonima 11, 12 i 13 .

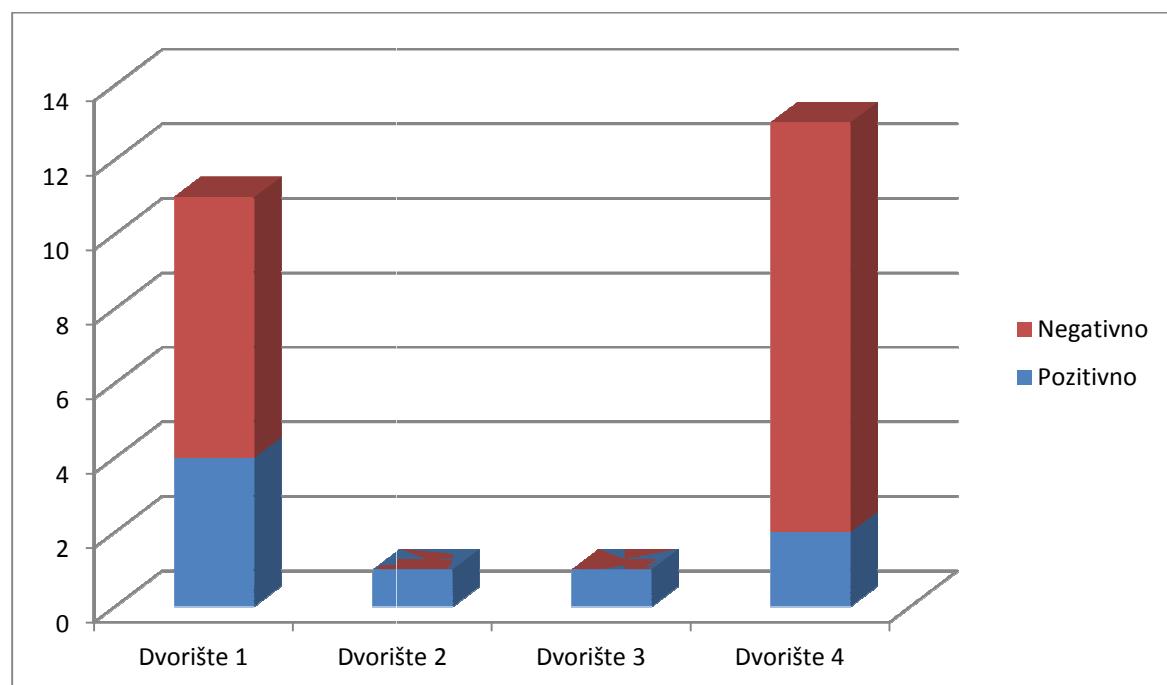
5.2.1.1. Skupina I - Zadarska županija – dvorišta sa seropozitivnim psima

U Zadarskoj županiji 8 seropozitivnih pasa otkriveno je u 4 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno 26 pasa. Prosječno se u dvorištu nalazilo 6,5 pasa od kojih je 2 bilo seropozitivno (31%) (Tablica 8.)

Tablica 8. Zadarska županija – dvorišta sa seropozitivnim psima

	Pozitivna dvorišta (4)				Σ
Broj seropozitivnih pasa	4	1	1	2	8
Broj seronegativnih pasa	7	0	0	11	18
Ukupno pasa u dvorištu	11	1	1	13	26

Grafikon 11. Zadarska županija - udio seropozitivnih pasa u pozitivnim dvorištima



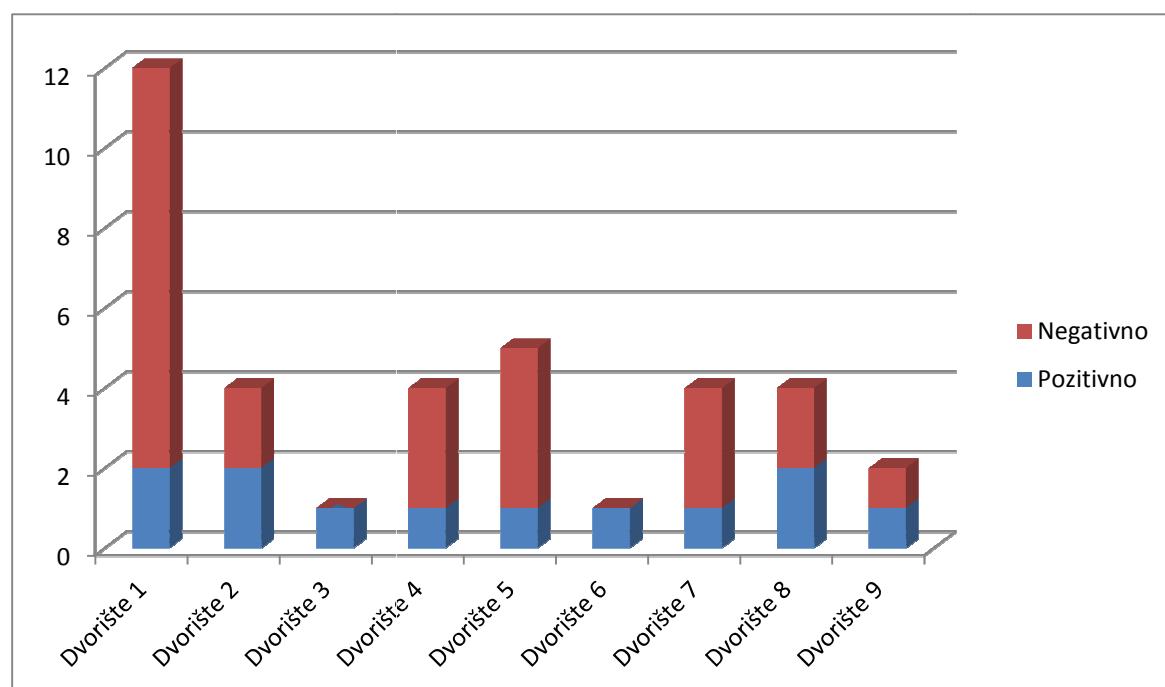
5.2.1.2. Skupina II - Šibensko-kninska županija – dvorišta sa seropozitivnim psima

U Šibensko-kninskoj županiji 12 seropozitivnih pasa otkriveno je u 9 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno 37 pasa. Prosječno se u dvorištu nalazilo 4,1 pasa od kojih je 1,3 bilo seropozitivno (32 %) (Tablica 9.).

Tablica 9. Šibensko-kninska županija – dvorišta sa seropozitivnim psima

	Pozitivna dvorišta (9)									Σ
Broj seropozitivnih pasa	2	2	1	1	1	1	1	2	1	12
Broj seronegativnih pasa	10	2	0	3	4	0	3	2	1	25
Ukupno pasa u dvorištu	12	4	1	4	5	1	4	4	2	37

Grafikon 12. Šibensko-kninska županija: Udio seropozitivnih pasa u pozitivnim dvorištima



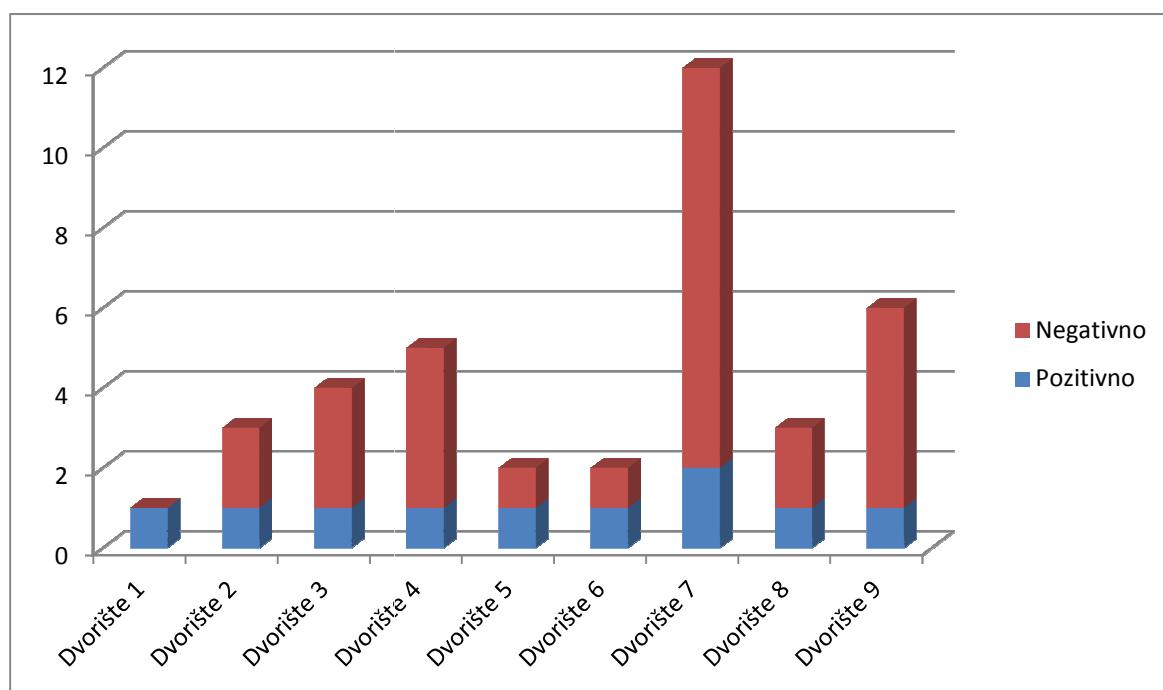
5.2.1.3. Skupina III - Splitsko-dalmatinska županija – dvorišta sa seropozitivnim psima

U splitsko-dalmatinskoj županiji 10 seropozitivnih pasa otkriveno je u 9 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno 38 pasa. Prosječno se u dvorištu nalazilo 4,2 pasa od kojih je 1,1 bilo seropozitivno (26,1%) (Tablica 10.)

Tablica 10. Splitsko-dalmatinska županija – dvorišta sa seropozitivnim psima

	Pozitivna dvorišta (9)									Σ
Broj seropozitivnih pasa	1	1	1	1	1	1	2	1	1	10
Broj seronegativnih pasa	0	2	3	4	1	1	10	2	5	28
Ukupno pasa u dvorištu	1	3	4	5	2	2	12	3	6	38

Grafikon 13. Splitsko-dalmatinska županija: Udio seropozitivnih pasa u pozitivnim dvorištima



5.2.2. Dvorišta s psima pozitivnim molekularnim metodama (PCR)

Ukupno je u cijelom području pretraživanja primjenom molekularnih metoda (PCR) otkriven 21 pozitivan pas u 18 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno i pretraženo 98 pasa.

Udio pasa pozitivnih molekularnim (PCR) metodama u ukupnom broju pasa u pozitivnim dvorištima po županijama prikazan je u tablicama 11, 12 i 13 i grafikonima 14, 15 i 16.

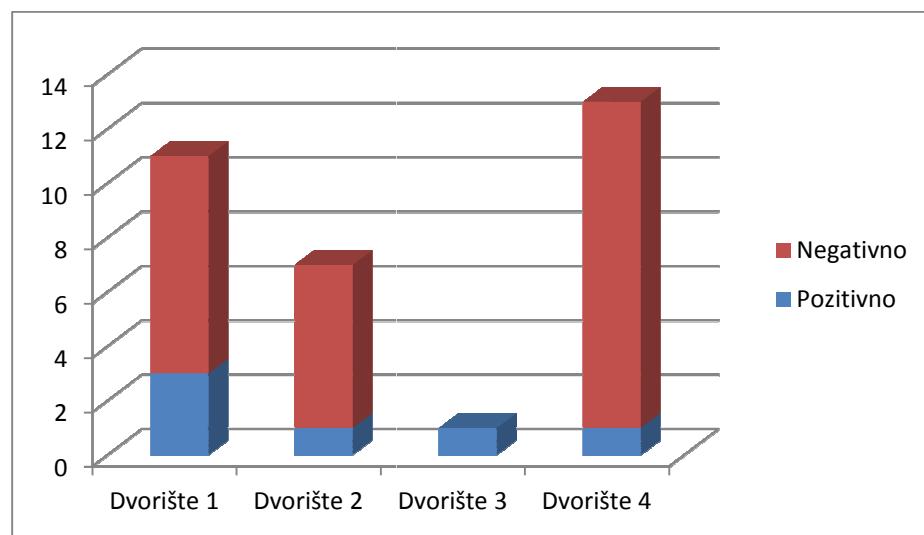
5.2.2.1. Skupina I - Zadarska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih metoda (PCR)

U Zadarskoj županiji molekularnim metodama (PCR) otkriveno je 6 pozitivnih pasa u 4 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno 32 psa. Prosječno se u dvorištima nalazilo 8 pasa od kojih je 1,5 molekularnim metodama (PCR) bilo pozitivno (18,8%) (Tablica 11.)

Tablica 11. Zadarska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih metoda (PCR)

	Pozitivna dvorišta (4)				Σ
Broj PCR pozitivnih pasa	3	1	1	1	6
Broj PCR negativnih pasa	8	6	0	12	26
Ukupno pasa u dvorištu	11	7	1	13	32

Grafikon 14. Zadarska županija – Udio pasa pozitivnih primjenom molekularnih metoda pretrage (PCR) u ukupnom broju pasa u PCR pozitivnim dvorištima



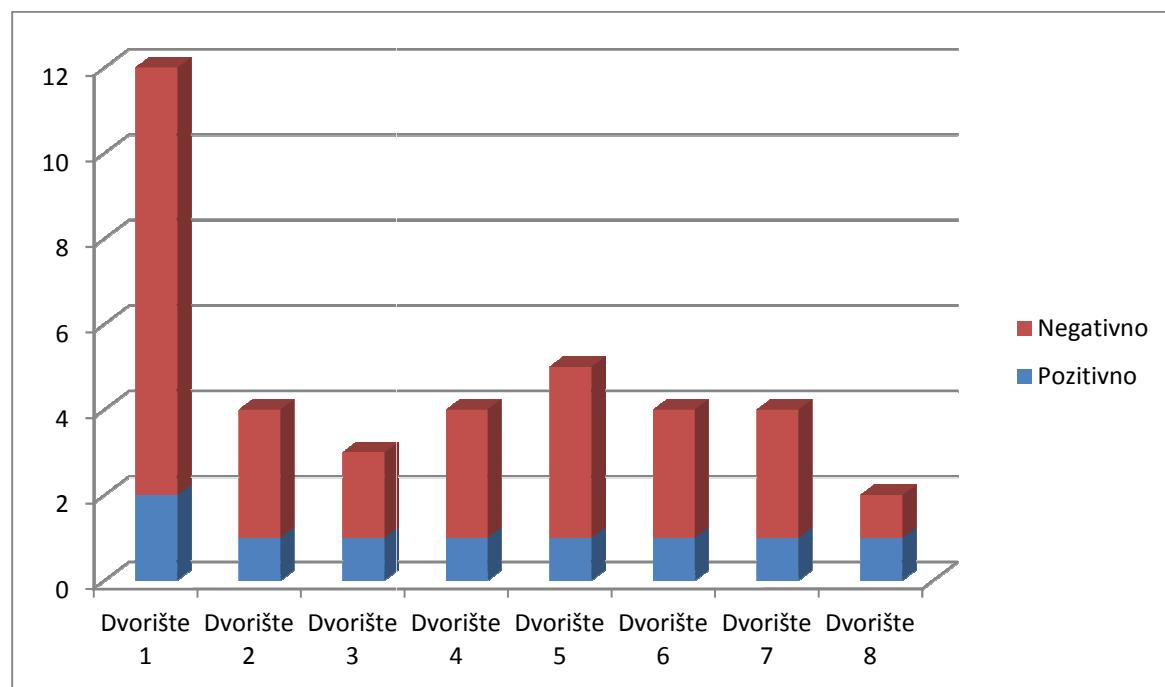
5.2.2.2. Skupina II - Šibensko-kninska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih metoda (PCR).

U Šibensko-kninskoj županiji PCR metodama otkriveno je 9 pozitivnih pasa u 8 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno 38 pasa. Prosječno se u dvorištima nalazilo 4,2 psa od kojih je 1,1 molekularnim metodama (PCR) bio pozitivan (23,7%) (Tablica 12.)

Tablica 12. Šibensko-kninska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih metoda (PCR).

	Pozitivna dvorišta (8)								Σ
Broj PCR pozitivnih pasa	2	1	1	1	1	1	1	1	9
Broj PCR negativnih pasa	10	3	2	3	4	3	3	1	29
Ukupno pasa u dvorištu	12	4	3	4	5	4	4	2	38

Grafikon 15. Šibensko-kninska županija – Udio pasa pozitivnih primjenom molekularnih metoda pretrage (PCR) u ukupnom broju pasa u PCR pozitivnim dvorištima



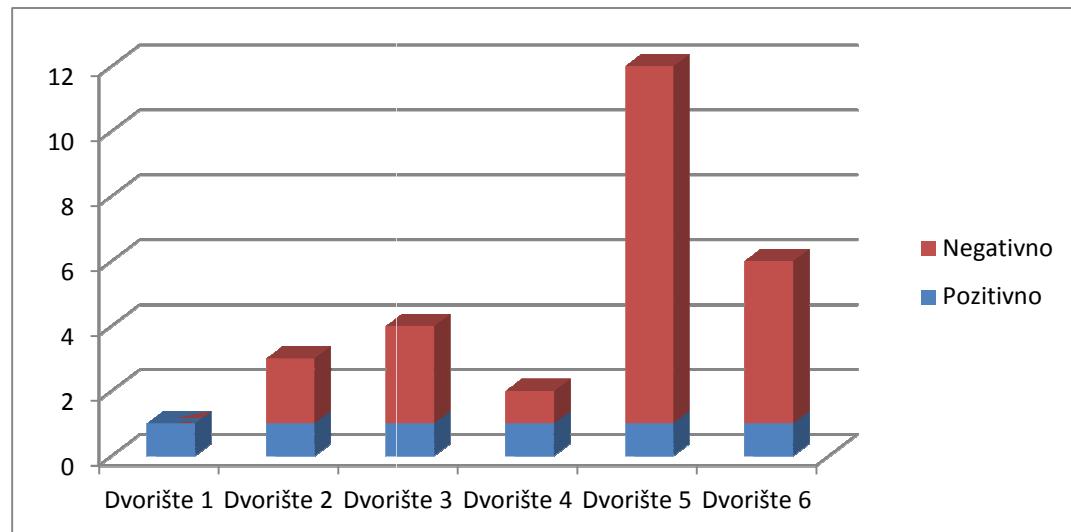
5.2.2.3. Skupina III - Splitsko-dalmatinska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih metoda (PCR).

U Splitsko-dalmatinskoj županiji PCR metodama otkriveno je 6 pozitivnih pasa u 6 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno 28 pasa. Prosječno se u dvorištu nalazilo 4,7 pasa od kojih je 1 bio PCR pozitivan (21,3%) (Tablica 13.)

Tablica 13. Splitsko-dalmatinska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih metoda (PCR).

	Pozitivna dvorišta (6)						Σ
Broj PCR pozitivnih pasa	1	1	1	1	1	1	6
Broj PCR negativnih pasa	0	2	3	1	11	5	22
Ukupno pasa u dvorištu	1	3	4	2	12	6	28

Grafikon 16. Splitsko-dalmatinska županija – Udio pasa pozitivnih primjenom molekularnih metoda pretrage (PCR) u ukupnom broju pasa u PCR pozitivnim dvorištima



5.2.3. PCR i serološki pozitivna dvorišta

U cijelom području pretraživanja molekularnim (PCR) i serološkim metodama otkriveno je 17 pozitivnih pasa u 15 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno i pretraženo 83 psa.

Udio pasa pozitivnih molekularnim (PCR) i serološkim metodama u ukupnom broju pasa u pozitivnim dvorištima po županijama prikazan je u tablicama 14, 15 i 16 i grafikonima 17, 18 i 19.

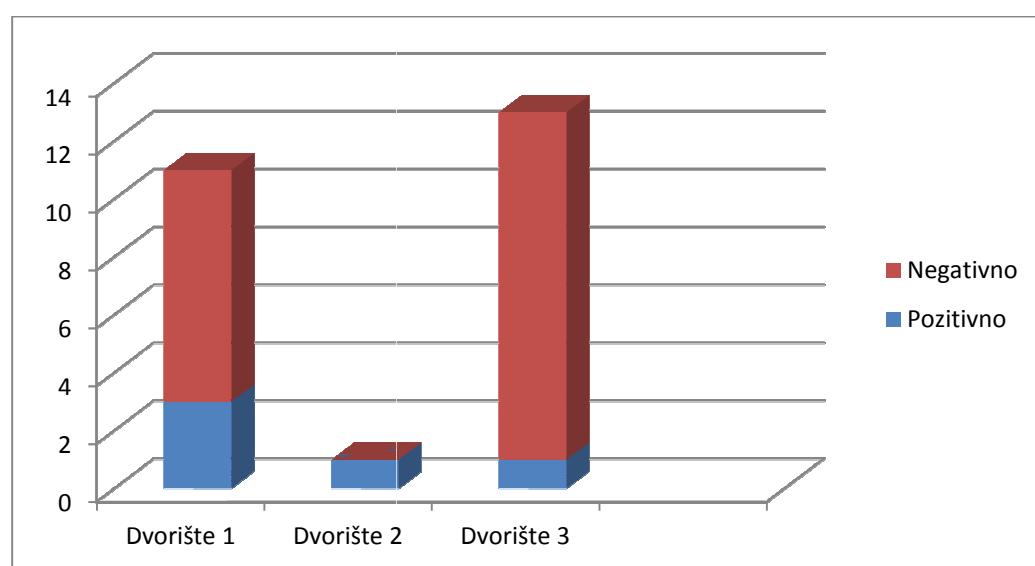
5.2.3.1. Skupina I - Zadarska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) i seroloških metoda te ukupan broj pasa u pozitivnim dvorištima

U Zadarskoj županiji molekularnim (PCR) i serološkim metodama otkriveno je 5 pozitivnih pasa u 3 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno 25 pasa. Prosječno se u dvorištu nalazilo 8,3 pasa od kojih je 1,7 bilo PCR i serološki pozitivno (20,5%) (Tablica 14.).

Tablica 14. Zadarska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim molekularnim i serološkim metodama naspram ukupnog broja pasa u pozitivnim dvorištima

	Pozitivna dvorišta (3)			Σ
Broj PCR i seropozitivnih pasa	3	1	1	5
Broj PCR i seronegativnih pasa	8	0	12	20
Ukupno pasa u dvorištu	11	1	13	25

Grafikon 17. Zadarska županija – Omjer pozitivnih i negativnih pasa (bilo kojom od metoda) u tri pozitivna dvorišta



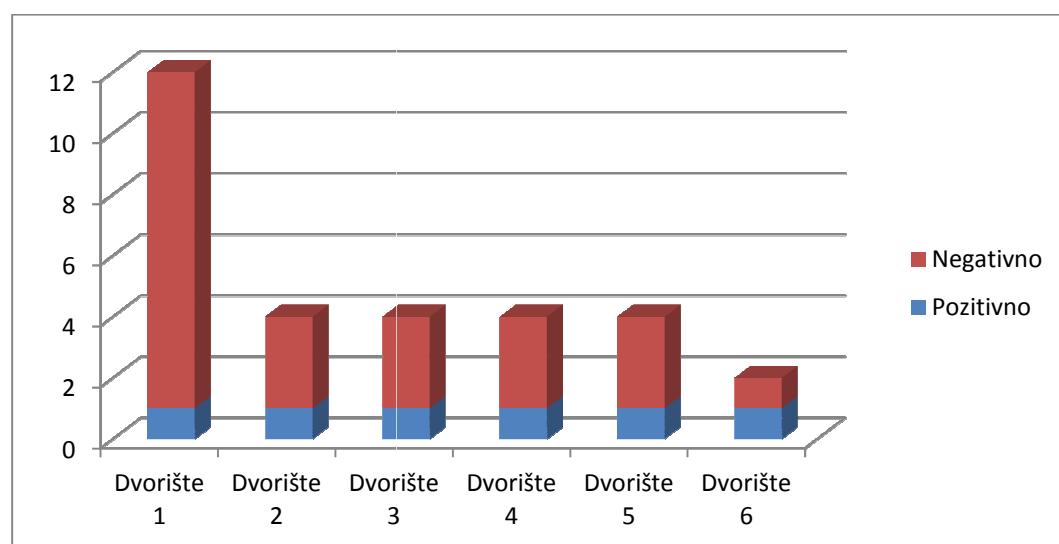
5.2.3.2. Skupina II - Šibensko-kninska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) i seroloških metoda te ukupan broj pasa u pozitivnim dvorištima

U Šibensko-kninskoj županiji molekularnim (PCR) i serološkim metodama otkriveno je 6 pozitivnih pasa u 6 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno 30 pasa. Prosječno se u dvorištu nalazilo 5 pasa od kojih je 1 bio i PCR i serološki pozitivan (20%) (Tablica 15.)

Tablica 15. Šibensko-kninska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) i seroloških metoda i ukupan broj pasa u pozitivnim dvorištima

	Pozitivna dvorišta (6)						Σ
Broj pozitivnih pasa	1	1	1	1	1	1	6
Broj negativnih pasa	11	3	3	3	3	1	24
Ukupno pasa u dvorištu	12	4	4	4	4	2	30

Grafikon 18. Šibensko-kninska županija – Udio pozitivnih pasa u ukupnom broju pasa u pozitivnim dvorištima



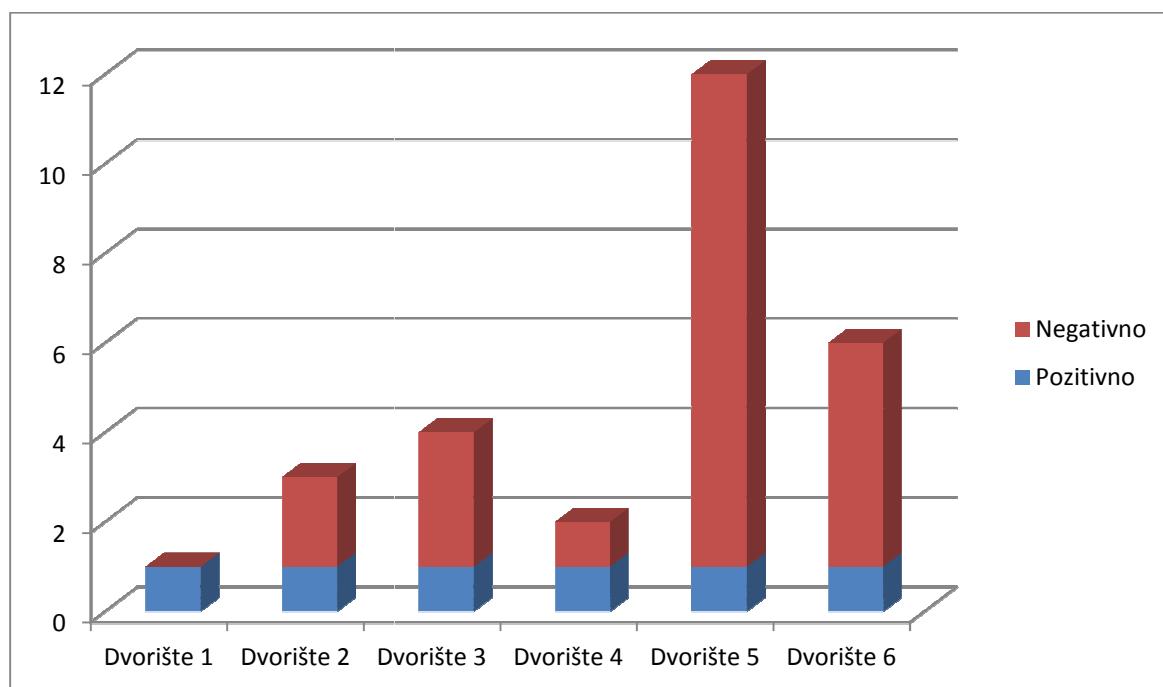
5.2.3.3. Skupina III - Splitsko-dalmatinska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) i seroloških metoda te ukupan broj pasa u pozitivnim dvorištima

U Splitsko-dalmatinskoj županiji molekularnim (PCR) i serološkim metodama otkriveno je 6 pozitivnih pasa u 6 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno 28 pasa. Prosječno se u dvorištu nalazilo 4,7 pasa od kojih je 1 bio PCR i serološki pozitivan (21,3%) (Tablica 16.)

Tablica 16. Splitsko-dalmatinska županija – Dvorišta sa psima pozitivnim primjenom molekularnih (PCR) i seroloških metoda i ukupan broj pasa u pozitivnim dvorištima

	Pozitivna dvorišta (6)						Σ
Broj pozitivnih pasa	1	1	1	1	1	1	6
Broj negativnih pasa	0	2	3	1	11	5	22
Ukupno pasa u dvorištu	1	3	4	2	12	6	28

Grafikon 19. Splitsko-dalmatinska županija – Udio pozitivnih u ukupnom broju pasa u pozitivnim dvorištima



U cijelom području pretraživanja molekularnim (PCR) i serološkim metodama otkriveno je 17 pozitivnih pasa u 15 dvorišta u kojima je ukupno zatečeno i pretraženo 83 psa.

5.3. Rezultati pretraga prema kategorijama pasa

Od pretraženih 185 lovačkih pasa, 24 je bilo seropozitivno, 16 je bilo pozitivno molekularnim, a 12 primjenom seroloških i molekularnih metoda.

Svih 35 pretraženih službenih pasa i 1 kućni pas bili su negativni svim primijenjenim metodama.

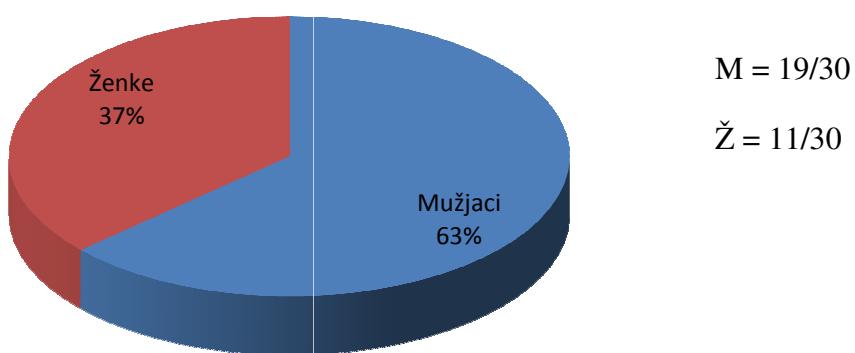
Od 18 pasa čuvara 5 je bilo seropozitivno, dok su 4 su bila pozitivna serološkim i molekularnim metodama.

Od 3 ovčarska psa, 1 je bio pozitivan serološkim i molekularnim metodama.

5.4. Rezultati pretraga prema spolu pasa

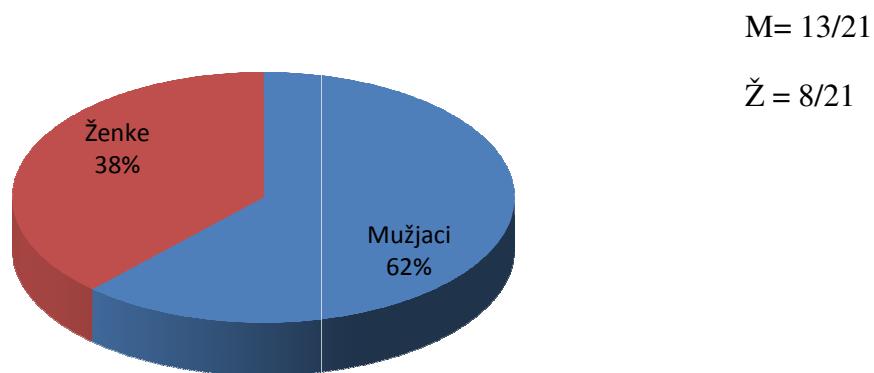
Razdioba seropozitivnih životinja prema spolu prikazana je u Grafikonu 20.

Grafikon 20. Spol seropozitivnih životinja



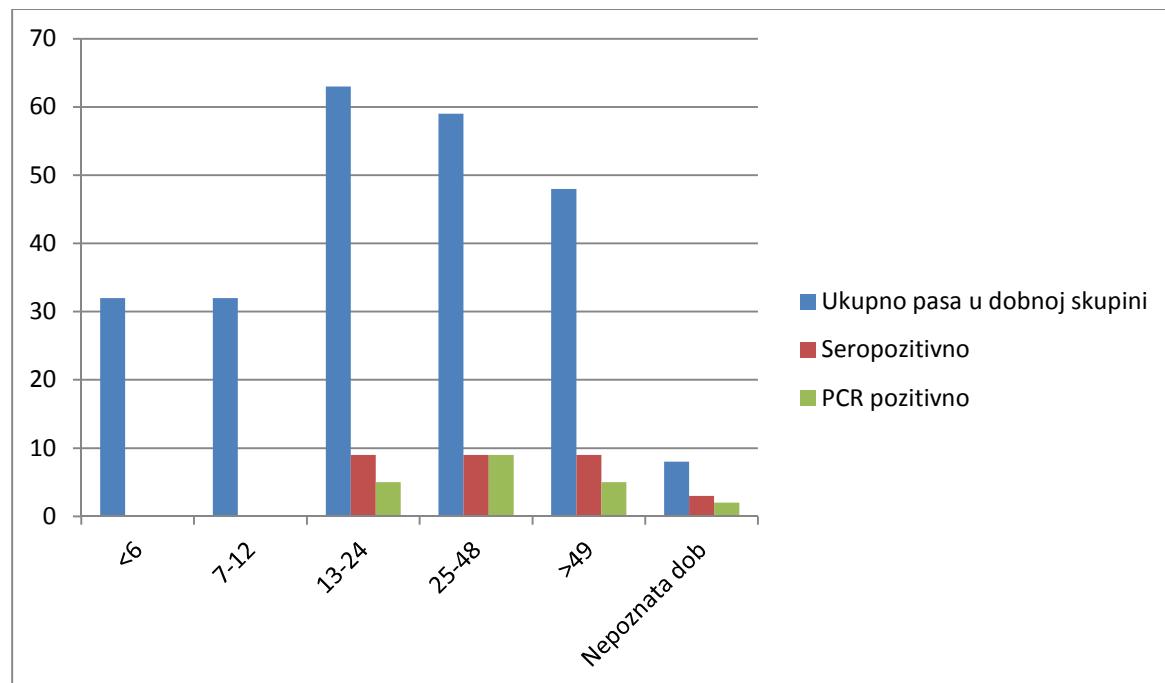
Razdioba molekularnim (PCR) metodama pozitivnih životinja prema spolu prikazana je u Grafikonu 21.

Grafikon 21. Spol životinja pozitivnih molekularnim (PCR) metodama



5.5. Rezultati pretraga prema dobnim skupinama pasa

Grafikon 22. Međusobni odnos ukupnog broja pasa po dobnim skupinama te udio serološki i PCR pozitivnih



U dobnim skupinama <6 mj i 7-12 mj. među 64 pretražena psa nije zabilježen niti jedan serološki ili molekularnim testovima pozitivan nalaz (prevalencija 0%) .

U dobroj skupini 13-24 mj. među 63 pretražena psa utvrđeno je 9 seropozitivnih (14,3%) i 5 (7,9%) pasa pozitivnih molekularnim testovima.

U dobroj skupini 25-48 mj. među 59 pretraženih psa utvrđeno je 9 seropozitivnih i 9 pasa pozitivnih molekularnim testovima (prevalencija 15,3 %).

U dobroj skupini >49 mj. među 48 pretraženih pasa utvrđeno je 9 seropozitivnih (18,8 %) i 5 pasa pozitivnih molekularnim testovima (10,4 %).

Među 8 pasa iz azila Benkovac za koje nismo imali podatke o starosti, utvrđena su 3 seropozitivna (37,5 %) i 2 psa pozitivna molekularnim testovima (25 %).

5.6. Pozitivni uzorci prema primijenjenim metodama

Pozitivni uzorci prikazani u različitim bojama ovisno o broju pozitivnih reakcija prikazani su u Tablici 17.

Tablica 17.

RED. BR.	ŽUP.	MJESTO	SPOL	DOB/MJ	KATEGORIJA	IFAT	ELISA	IDEXX SNAP test	Dya Sys rK39	ITS- PCR 1	kDNA PCR	Nested PCR
1	Z	Benkovac	Ž	-	Čuvar		+					+
2	Z	Benkovac	Ž	-	Čuvar		+					
3	Z	Benkovac	M	36	Čuvar		+	+		+	+	
4	Z	Benkovac	M	-	Čuvar		+	+		+	+	
5	Z	Vrana	Ž	18	Lovački		+					
6	Z	Vrana	M	24	Lovački					+	+	
7	Z	Vrana	Ž	48	Lovački		+			+		
8	Z	Biograd n/M	M	48	Lovački		+					+
9	Z	Biograd n/M	M	24	Lovački		+					
10	ŠK	Vrpolje	M	156	Ovčarski pas	Pozitivno 1/80	+	+	+		+	+
11	ŠK	Vrpolje	Ž	60	Lovački		+					
12	ŠK	Vrpolje	Ž	36	Lovački					+		
13	ŠK	Vrpolje	M	15	Lovački		+			+	+	
14	ŠK	Vrpolje	M	96	Lovački		+					
15	ŠK	Vrpolje	M	30	Lovački					+		
16	ŠK	Vrpolje	M	60	Lovački		+					
17	ŠK	Vrpolje	Ž	60	Lovački	Pozitivno 1/80	+	+	+		+	+
18	ŠK	Knin	M	36	Lovački		+					
19	ŠK	Knin	Ž	60	Lovački					+		
20	ŠK	Knin	M	132	Lovački		+					
21	ŠK	Knin	Ž	36	Lovački			+			+	
22	ŠK	Knin	M	48	Lovački	Pozitivno 1/640	+	+	+	+	+	+
23	ŠK	Knin	Ž	24	Lovački			+				
24	ŠK	Potkonje	M	18	Lovački			+		+		

Tablica 17. - nastavak

RED. BR.	ŽUP.	MJESTO	SPOL	DOB/MJ	KATEGORIJA	IFAT	ELISA	IDEXX SNAP test	Dya Sys rK39	ITS- PCR 1	kDNA PCR	Nested PCR														
25	SD	Sinj	M	84	Čuvar	Pozitivno 1/640	+		+	+	+	+														
26	SD	Ježević	M	30	Lovački		+				+															
27	SD	Ježević	Ž	30	Lovački	Pozitivno 1/320	+	+	+	+	+	+														
28	SD	Cetina	M	108	Lovački		+																			
29	SD	Sinj	M	84	Lovački			+			+															
30	SD	Sinj	M	36	Lovački			+																		
31	SD	Brnaze	Ž	18	Lovački		+				+															
32	SD	Brnaze	M	18	Lovački		+																			
33	SD	Brnaze	Ž	18	Lovački		+																			
34	SD	Lučane	M	18	Lovački		+				+															
Σ						5	25	11	5	2	18	12														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10px; height: 10px;"></td><td>Pozitivno 1 metodom</td></tr> <tr> <td style="width: 10px; background-color: #0070C0; height: 10px;"></td><td>Pozitivno s 2 metode</td></tr> <tr> <td style="width: 10px; background-color: #9B59B6; height: 10px;"></td><td>Pozitivno s 3 metode</td></tr> <tr> <td style="width: 10px; background-color: #F0A000; height: 10px;"></td><td>Pozitivno s 4 metode</td></tr> <tr> <td style="width: 10px; background-color: #2ECC71; height: 10px;"></td><td>Pozitivno s 5 metoda</td></tr> <tr> <td style="width: 10px; background-color: #F39C12; height: 10px;"></td><td>Pozitivno s 6 metoda</td></tr> <tr> <td style="width: 10px; background-color: #E74C3C; height: 10px;"></td><td>Pozitivno s 7 metoda</td></tr> </table>														Pozitivno 1 metodom		Pozitivno s 2 metode		Pozitivno s 3 metode		Pozitivno s 4 metode		Pozitivno s 5 metoda		Pozitivno s 6 metoda		Pozitivno s 7 metoda
	Pozitivno 1 metodom																									
	Pozitivno s 2 metode																									
	Pozitivno s 3 metode																									
	Pozitivno s 4 metode																									
	Pozitivno s 5 metoda																									
	Pozitivno s 6 metoda																									
	Pozitivno s 7 metoda																									

5.7. Statističke razlike

Tablica 18. Porijeklo, spol i dob pretraženih pasa

ŽUPANIJA (Skupina)	Broj pretraženih pasa	Dob (mjeseci)	Spol M/Ž
		Median (min-max)	
Zadarska (I)	64 (26.45)	36 (2-144)	35/29
Šibensko-kninska (II)	43 (17.77)	41 (5-156)	28/15
Splitsko-dalmatinska (III)	135 (55.79)	18 (3.5-144)	80/55
Ukupno	242	P=0.0002	P=0.560

Opažene razlike u dobi pasa između županija statistički su se razlikovale između županija dok je spolna struktura promatranog uzorka pasa podjednaka u svim županijama.

Tablica 19. Broj pretraženih pasa i broj reaktora prema pojedinim testovima

Kategorija	Čuvar	Kućni	Lovački	Ovčarski	Službeni
N	18	1	185	3	35
(% od ukupnog broja)	(7.44)	(0.41)	(76.45)	(1.24)	(14.46)
ELISA	5	0	19	1	0
IFAT	1	0	3	1	0
IDEXX SNAP	2	0	8	1	0
Dya Sys rK39	1	0	3	1	0
ITS -1 PCR	0	0	2	0	0
kDNA PCR	3	0	14	1	0
NESTED PCR	4	0	7	1	0
Serološki	5	0	24	1	0
Molekularni	4	0	16	1	0
Bilo koji test	5	0	28	1	0

Tablica 20. Razdioba životinja prema dobnim skupinama

Dob (mjeseci)	N	%
< 6	32	13.68
7-12	32	13.68
13-24	63	26.92
25-48	59	25.21
≥49	48	20.51

Tablica 21. Veličina skupina iz kojih potječu pretražene životinje

Broj pasa u uzgoju	Broj pasa	%
1	17	7.02
2-5	98	40.50
6-10	31	12.81
11-15	61	25.21
16 i više	35	14.46

Od 242 pretražena psa, 208 (86%) bilo je negativno neovisno o vrsti primijenjenog testa. Dva pretražena psa su bila pozitivna sa svim testovima (Tablica 22).

Tablica 22. Rezultati provedenih testova

Broj pozitivnih reakcija na testove	N	%
0	208	85.95
1	16	6.61
2	10	4.13
3	1	0.41
4	2	0.83
5	1	0.41
6	2	0.83
7	2	0.83

Tablica 23. Povezanost rezultata testa s čimbenicima rizika (p vrijednosti, hi-kvadrat i Fisher exact test)

Metoda	% pozitivnih	Spol	Dob	Kategorija	Lokacija (županija)	Broj pasa u dvorištu
ELISA	1.65	0.586	0.036	0.019	0.016	0.004
IFAT	2.07	0.668	0.088	0.054	0.380	0.567
IDEXX SNAP	4.55	0.754	0.247	0.057	0.007	0.221
Dya Sys rK39	2.07	0.967	0.122	0.054	0.064	0.567
ITS – 1 PCR	0.83	0.652	0.291	1.000	0.394	0.795
kDNA PCR	7.44	0.856	0.046	0.059	0.002	0.211
Nested PCR	4.96	0.369	0.425	0.004	0.064	0.387
Serološke	12.4	0.614	0.005	0.010	0.002	0.005
Molekularne	8.68	0.784	0.029	0.020	0.004	0.228

Univarijantnom statističkom analizom utvrđeno je da su rezultati pojedinih testova statistički povezani s dobi (ELISA, kDNA PCR i blago IFAT), s kategorijom (ELISA, IFAT, Nested

PCR i blago IDEXX SNAP, Dya Sys rK39 i kDNA PCR) te sa županijom podrijetla životinje (svi testovi osim IFAT i ITS-1 PCR , a blago povezan je rezultat Nested PCR). Rezultati ELISA testa bili su statistički povezani s veličinom skupine iz koje potječu ($p=0.004$).

Tablica 24. Povezanost rezultata ELISA testa s čimbenicima

Čimbenik	Odds Ratio*	95% Interval povjerenja	P
Županija (Skupina)	0.94	0.55 - 1.64	0.826
Broj pasa u uzgoju	0.84	0.53-1.33	0.46
Kategorija	0.72	0.35 – 1.48	0.370
Dobna skupina	1.67	1.06 - 2.61	0.026

Odds Ratio* = Omjer vjerojatnosti

Logističkom regresijom provjerena je povezanost rezultata svakog pojedinog testa s onim čimbenicima rizika koji su univarijantnom analizom bili u jačoj ili blažoj vezi. Utvrđeno je da je dob pasa statistički značajno povezana s rezultatima ELISA testa uz istovremenu kontrolu kategorije i podrijetla životinje. U svakoj sljedećoj dobnoj kategoriji u nizu vjerojatnost za pozitivan rezultat ELISA testom bio je 1.67 puta veća nego li u susjednoj mlađoj dobnoj skupini ($p=0.026$).

Tablica 25. Povezanost rezultata IFAT testa s čimbenicima

Čimbenik	Odds Ratio	95% Interval povjerenja	P
Kategorija	0.73	0.32 - 1.63	0.442
Dobna skupina	2.8	0.98 - 7.94	0.053

Tablica 26. Povezanost rezultata IDEXX SNAP testa s čimbenicima

Čimbenik	Odds Ratio	95% Interval povjerenja	P
Kategorija	1.07	0.5 - 2.32	0.854
Dobna skupina	1.87	0.99 - 3.55	0.055

Logističkom regresijom utvrđena je blaga povezanost rezultata IFAT testa i IDEXX SNAP testa s dobnom skupinom kojoj je životinja pripadala uz kontrolu kategorije životinje. Tako je vjerojatnost za pozitivan ishod IFAT testa u svakoj starijoj dobroj skupini rasla za 2.8 puta ($p=0.053$) a za pozitivan rezultat IDEXX SNAP testa za 1.87 puta ($p=0.055$).

Tablica 27. Povezanost rezultata Dya Sys rK39 testa s čimbenicima

Čimbenik	Odds Ratio	95% Interval povjerenja	P
Kategorija	1.03	0.47 - 2.27	0.939
Županija (Skupina)	1.18	0.39 - 3.53	0.772

Logističkom regresijom utvrđeno je da rezultati Dya Sys rK39 testa nisu statistički povezani s čimbenicima rizika.

Tablica 28. Povezanost rezultata testa kDNA PCR s čimbenicima

Čimbenik	Odds Ratio	95% Interval povjerenja	P
Županija (Skupina)	0.91	0.5 - 1.68	0.777
Kategorija	1.08	0.59 - 1.99	0.798
Dobna skupina	1.8	1.09 - 2.97	0.022

Vjerojatnost da će životinja starije dobne skupine biti pozitivna kDNA PCR testom bila je 1.8 puta veća i statistički značajna ($p=0.022$) u usporedbi sa mlađom skupinom.

Tablica 29. Povezanost rezultata testa Nested PCR s čimbenicima (1-Z 2-SK 3-SD)

Nested PCR	Odds Ratio	95% Interval povjerenja	P
Kategorija	0.45	0.24 – 0.87	0.018
Županija	0.72	0.36 - 1.46	0.369

Rezultati Nested PCR testa statistički su povezani s kategorijom (namjenom) pasa ($p=0.018$).

Tablica 30. Međusobna podudarnost rezultata testova

	IFAT	ELISA	IDEXX SNAP test	Dya Sys rK39	ITS - 1PCR	kDNA PCR
ELISA	0.3096					
IDEXX SNAP test	0.485	0.2882				
Dya Sys rK39	1	0.3095	0.4854			
ITS - 1PCR	0.566	0.1349	0.2979	0.5663		
kDNA PCR	0.416	0.4652	0.5980	0.4159	0.1879	
Nested PCR	0.576	0.5653	0.4979	0.576	0.2754	0.5747

Podudarnost rezultata različitih testova prikazana je u tablici. Rezultati polučeni metodom IFAT i Dya Sys rK39 savršeno su se podudarali. Međusobna podudarnost ostalih testova bila je za oko polovicu mogućih kombinacija umjerena, odnosno u rasponu vrijednosti od 0.4-0.6 ili slaba (0.2-0.4).

Tablica 31. Podudarnost seroloških i molekularnih metoda

		Molekularne	Ukupno
Serološke		negativno	pozitivno
negativno		208	4
pozitivno		13	17
Ukupno		221	21
Kappa		0.629	

Stupanj podudarnosti Kappa testom nešto je viši (0.629) ukoliko se serološki pozitivnim uzorkom smatra uzorak koji je najmanje jednom serološkom metodom polučio pozitivan rezultat, a molekularno (PCR) pozitivnim uzorak s najmanje jednim pozitivnim ishodom primjenom molekularnih metoda. No, čak i tada stupanj podudarnosti jedva prelazi gornju granicu umjerene podudarnosti koje iznose 0.4-0.6.

Tablica 32. Rezultati univariatne statističke analize povezanosti seroloških i molekularnih metoda s čimbenicima rizika

Metode	Spol	Dob	Kategorija	Lokacija (županija)	Broj pasa u dvorištu
Serološke	0.614	0.005	0.010	0.002	0.005
Molekularne	0.784	0.029	0.020	0.004	0.228

Univariantnom statističkom analizom primjenom Hi kvadrat testa provjerena je povezanost rezultata seroloških i molekularnih testova s mogućim čimbenicima rizika. Rezultati su za obje skupine bili povezani s dobi, kategorijom i županijom podrijetla životinje.

Tablica 33. Rezultati logističke regresije povezanosti rezultata seroloških testova s čimbenicima rizika

Čimbenik	Odds Ratio	95% Interval povjerenja	P
Kategorija	0.8	0.4 – 1.62	0.539
Broj pasa u uzgoju	0.73	0.47 – 1.13	0.159
Županija	1.01	0.62 - 1.67	0.942
Dobna skupina	1.61	1.07 - 2.44	0.021

Uvrštavanjem čimbenika u model logističke regresije, utvrđeno je da su rezultati pretraga serološkim pretragama povezani s dobi uz istodobnu kontrolu ostalih čimbenika. Vjerovatnost da će životinja biti pozitivna serološkim testom raste za 1.61 puta sa svakim porastom dobi za jednu mjernu jedinicu (odnosno prijelazom iz niže dobne kategorije u višu dobnu kategoriju).

Tablica 34. Rezultati logističke regresije povezanosti rezultata molekularnih testova s čimbenicima rizika

Čimbenik	Odds Ratio	95% Interval povjerenja	P
Kategorija	1.15	0.63 - 2.11	0.644
Županija	0.89	0.5 - 1.58	0.685
Dobna skupina	1.68	1.05 - 2.67	0.030

Sličan trend uočen je i kada su u pitanju rezultati genetskih metoda. Vjerovatnost da će životinja biti pozitivna genetskim testom raste za 1.68 puta sa svakim porastom dobi za jednu mjernu jedinicu (odnosno prijelazom iz niže dobne kategorije u višu dobnu kategoriju).

6. RASPRAVA

Lišmanioza pasa, koju uzrokuje *Leishmania infantum*, je bolest od osobitog značaja u veterinarskoj medicini i javno zdravstveni problem. Istraživanja kojima se istovremeno uspoređuje osjetljivost seroloških i molekularnih metoda su malobrojna, a provođena su u malim skupinama pokusno invadiranih pasa ili tijekom praćenja uspješnosti liječenja (MIRÓ i sur., 2009) ili je provođena validacija primjenom jedne do tri serološke i jedne molekularne metode (NASEREDDIN i sur., 2006., WANG i sur., 2011., HAMERSHEH i sur., 2012.).

U enzootskim područjima se uglavnom testira seroprevalencija, pa se preferiraju različite serološke metode ovisno o dostupnosti, osjetljivosti, specifičnosti i cijeni, samostalno ili u kombinaciji s parazitološkom dijagnostikom (BALLART i sur., 2013).

Prema rezultatima dosad provedenih seroepidemioloških istraživanja u Republici Hrvatskoj, bolest je enzootska u tri dalmatinske županije, gdje predstavlja problem za veterinare i vlasnike pasa, te potencijalnu opasnost za zdravljje ljudi.

Seroprevalencija među psima u tim područjima varira od 0-40% ovisno o lokaciji (ŽIVIČNJAK i sur., 2005.) i poduzetim mjerama (ŽIVIČNJAK i sur., 2007.).

Enzootska lišmanioza dosad nije utvrđena u drugim regijama Hrvatske, ali u njima nije niti provođeno testiranje. Izuzetak je serološko (IFAT) i molekularno (kDNA) testiranje provedeno na otoku Krku kod 80 lovačkih pasa u listopadu 2009. godine; svi su psi bili negativni (T. Živičnjak – usmeno priopćenje). Odlukom Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva u razdoblju od 2002-2005. godine, na snazi je bila *Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju*, prema kojoj su na području Dubrovačko-neretvanske, Šibensko-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 su odredbe koje su se odnosile na otkrivanje i suzbijanje lišmanioze pasa ukinute iz Naredbe, iako su rezultati seroepizootioloških istraživanja naizgled zdravih pasa u enzootskom području tijekom 2005. godine pokazali da je 7,9 % pasa (141/1776), bilo serološki pozitivno (ŽIVIČNJAK i sur., 2007.).

Posljednjih godina vlasnici pasa na području Dalmacije su nešto bolje upoznati s problemom lišmanioze koju su do prije petnaestak godina nazivali „neizlječiva šuga“, „upala očiju“ ili „reuma“. Za oboljele pse obično nisu tražili veterinarsku pomoć, već su ih eutanazirali i nabavljali nove (ŽIVIČNJAK i sur., 2007.).

Unatoč upoznatosti s problematikom, vlasnici lovačkih pasa i uzgajivači nisu u stanju financirati troškove serološkog testiranja u cijelim uzgojima, odnosno otkrivanje subklinički invadiranih pasa. Bitno je naglasiti da lovci u Dalmaciji nerijetko posjeduju desetak i više pasa. Stoga obično zahtijevaju serološku pretragu samo klinički sumnjivog psa, pa ukoliko je seropozitivan, zaliče ga i prodaju. Daljnje praćenje postupka s bolesnom životinjom nije zakonski regulirano pa se takvi psi uvoze, posuđuju, namjerno i nemamjerno stavlju u uzgoj i prodaju (ŽIVIČNJAK i sur., 2008.).

Veterinari na terenu primjenjuju isključivo brze testove za dijagnostiku lišmanioze, kojima se ne može odrediti titar protutijela, a većina ih nije niti dovoljno osjetljiva za detekciju nižeg titra kod seropozitivnih klinički zdravih pasa (ŽIVIČNJAK i sur., 2008.).

6.1. Područje pretraživanja i uzorci

Pretraživanjem obavljenim izvan sezone aktivnosti vektora, obuhvatili smo ukupno 242 naizgled zdrava psa, raznih pasmina i kategorija. Najveći broj pretraženih pasa bili su lovački, većinom čistokrvni psi. Lovci su pokazali osobiti interes za dijagnostiku i liječenje, jer je dio njih već izgubio pse zbog lišmanioze. Istraživanje je provedeno u Zadarskoj (I), Šibensko-kninskoj (II) i Splitsko-dalmatinskoj (III) županiji (skupini). Zbog preglednosti rezultata, najlogičnija podjela u skupine je bila podjela po pripadnosti županiji. Zastupljenost mužjaka u pretraženoj populaciji bila je veća (59%) u odnosu na ženke (41%), što je najvećim dijelom posljedica sklonosti lovaca držanju muških pasa. Način držanja u pravilu je isti na svim pretraživanim terenima. Lovački psi se u Dalmaciji i zaledu obično drže grupno u otvorenim ili natkritim boksovima, udaljenim nekoliko desetaka, pa i stotinjak metara od kuća. Uvjeti u okolini pasjih nastamba i dvorištima kuća obično su vrlo pogodni za preživljavanje papatača. Nisko drveće i grmlje, suhozidovi, presušeni bunari te peradnjaci, pogodna su mjesta za boravak insekta posrednika, dok je obilje organske tvari, od ostataka hrane i nakupljenog izmeta, idealno za razvoj ličinki.

Na pretraženom području u vrijeme uzimanja uzoraka, prema službenim podacima nadležnih Veterinarskih ureda, cijepljeno protiv bjesnoće i označeno mikročipovima bilo je 15354 pasa u Splitsko-dalmatinskoj, 7166 u Šibensko-kninskoj i 7541 u Zadarskoj županiji. Stvarni broj prisutnih pasa na navedenim područjima je zasigurno znatno veći. Stoga se naš uzorak ne može smatrati reprezentativnim za cijelu populaciju pasa na pretraživanom području.

6.2. Međusobni odnos serološki i molekularno pozitivnih uzoraka

Od 242 pretražena psa, 34 su bila pozitivna barem jednom od 7 primijenjenih seroloških ili molekularnih metoda, što daje privid visoke ukupne prevalencije od 14%.

Serološka prevalencija u cijelom pretraživanom području testirana je primjenom 4 serološke metode. 30 pasa bilo je pozitivno barem jednom od primijenjenih seroloških metoda, što čini 12,3% od ukupno pretraženih pasa.

21 pas (8,6 % od ukupno pretraženih) bio je pozitivan barem jednom od 3 primijenjene molekularne metoda (PCR). 18 od ovih pasa (85,7%) bilo je pozitivno barem jednom od 4 primijenjene serološke metode. Preostala 3 psa (14,3%) koja u trenutku uzorkovanja nisu bila seropozitivna su ili zatečeni u ranoj fazi invazije, pa još nisu razvila dokaziv titar protutijela ili su rezistentni. Mjesta u kojima su psi bili pozitivni serološkim i molekularnim metodama se osim jedne iznimke (selo Cetina) u potpunosti podudaraju.

Od 30 seropozitivnih pasa 17 je istovremeno bilo pozitivno i jednom od 3 primijenjene molekularne metode. Preostalih 13 su bili serološki pozitivni samo sa po jednom od seroloških metoda i to ELISA (11 pasa) i SNAP IDEXX (2 psa).

Dobiveni su rezultati posljedica visoke osjetljivosti ili slabe specifičnosti spomenutih imunoenzimnih testova. Postoji mogućnost da se radilo o perzistirajućim protutijelima nakon spontane eliminacije uzročnika ili izlječenja primjenom odgovarajuće terapije (MARTÍNEZ i sur., 2011; MIRÓ i sur., 2011), te mogućnost nespecifičnih ili unakrižnih seroloških reakcija.

Razlog može biti i nešto niža osjetljivost PCR metoda na uzorcima krvi, jer je parazit u perifernoj krvi obično prisutan u malom broju (FISA i sur., 2001; MANNA i sur., 2004; NUNES i sur. 2007.).

Poznato je i da osjetljivost PCR metoda značajno varira ovisno o vremenu proteklom od trenutka invazije. U vrlo ranoj fazi osjetljivost može biti nula, a dostiže vrhunac od 78-88% počevši od 0-135 dana od invazije. Nakon toga pada na oko 50%. Razlog ovog pada može biti u povlačenju uzročnika (QUINELL i sur., 2001.).

Razmjerno visoka prevalencija subkliničkih invazija može ukazivati na određeni stupanj razvoja staničnog imuniteta koji sprječava pojavu kliničkih simptoma bolesti (CABRAL i sur., 1998.).

18 pasa istodobno je bilo pozitivno s 2 ili više metoda, a svi osim jednog, pozitivnog s dvije PCR metode, bili su pozitivni i serološkim i molekularnim metodama.

Preostalih 16 pozitivnih pasa reagiralo je samo s jednom od primijenjenih metoda, i to: 11 s imunoenzimnim testom (ELISA INGENASA), 2 s SNAP IDEXX i 3 s kDNA PCR.

6.3. Pregled rezultata po županijama

U Zadarskoj županiji (I) koja je smatrana područjem slobodnim od enzootske lišmanioza pasa utvrđena je seroprevalencija od 12,5 %. Iako su 4 seropozitivna psa zatečena u azilu Benkovac i porijeklo im je nepoznato, preostala 4 su lovački psi zatečeni kod 3 različita vlasnika u Biogradu n/M i obližnjem selu Vrana. Nije moguće utvrditi da li se u prvom slučaju radi o psima dolatalim iz enzootskog područja, koji su potom prihvaćeni u lokalni azil ili su se invadirali na području gdje su zatečeni. Isto tako nismo doznali da li se u slučaju lovačkih pasa radi o kupoprodaji iz enzootskog područja ili psi potječu s područja Biograda n/M.

Nalaz 2 seropozitivna psa različitih pasmina i dobi u istom uzgoju ukazuje na vjerljiv prijenos unutar uzgoja i nastajanje žarišta. Iako na području zadarske županije nisu vršena entomološka istraživanja na prisutnost kompetentnih vektora za lišmanije, činjenica da su pronađeni u znatno sjevernijim područjima duž jadranske obale i unutrašnjosti ukazuje na njihovo vrlo vjerljivo prisustvo i na ovim područjima.

Obzirom na navedeno, možemo ustvrditi da na području Zadarske županije već postoje rezervoari uzročnika koji uz prisutnost kompetentnog vektora čine osnovnu za širenje bolesti.

Neočekivano visoka seroprevalencija od 27,9 %, utvrđena je među pretraženim psima na području Knina u Šibensko-kninskoj županiji (II), gdje je i dosad bilo serološki pozitivnih slučajeva, uglavnom kod klinički bolesnih ili sumnjivih pasa. 12 seropozitivnih pasa potjecalo je iz čak 9 dvorišta, pa se može pretpostaviti da postoji veliki broj žarišta.

Kretanje bolesti na temelju dobivenih rezultata ne može se objektivno procijeniti jer se na tom terenu slična istraživanja dosad nisu provodila, pa nema niti rezultata za usporedbe i eventualnu procjenu trenda.

Nižu seroprevalenciju od očekivane utvrdili smo u Splitsko-dalmatinskoj županiji (III) koja je potvrđeno enzootsko područje. Iako je najveći broj pretraženih pasa potjecao s tog terena (135), serološki pozitivnih bilo je 10 (7,4%). Utvrđena stopa seroprevalencije neznatno je niža od one koja je 2005. g. zabilježena u enzootskom području Splitsko-dalmatinske županije (ŽIVIČNJAK i sur., 2007.).

Iako se rezultati teško mogu uspoređivati budući su dobiveni primjenom različitih seroloških metoda, neočekivano niska seroprevalencija može se objasniti boljom upoznatošću vlasnika

pasa i veterinara Splitsko-dalmatinske županije s problematikom lišmanioze. Na tom području se vlasnici „rješavaju“ klinički bolesnih, pa čak i samo sumnjivih pasa.

Razlike u seroprevalenciji među županijama zasigurno su dijelom rezultat značajnih razlika u prosječnoj dobi populacije pretraženih pasa. Prosječno najmlađa populacija pasa bila je u Splitsko-dalmatinskoj županiji (prosjek 18 mj.) gdje je utvrđena i najniža seroprevalencija (7,4%). Prosječna dob pasa u Zadarskoj županiji bila je 36 mj, a udio seropozitivnih iznosi je 12,5%. U Šibensko-kninskoj županiji je utvrđena daleko najviša seroprevalencija od 27,9% i najstarija populacija pasa (prosjek 41 mj.)

Utvrđena seroprevalencija kod pasa u enzootskom području Dalmacije u okvirima je rezultata zabilježenih u enzootskim područjima drugih mediteranskih zemalja.

Negativan rezultat kod 40 pretraženih pasa u gradu Trilju je najvjerojatnije posljedica slučaja odnosno provođenja pretrage u malom broju dvorišta (2).

6.4. Pregled rezultata prema broju pasa u dvorištima

Pod dvorištem smatramo svako mjesto ili prostor gdje jedan ili više pasa stalno ili privremeno borave ili se uzgajaju. Katkad se u jednom dvorištu nalaze psi više različitih posjednika.

U 35 dvorišta s ukupno 131 psom (prosječno 3,7 pasa po dvorištu), nije bilo pozitivnih reakcija niti jednom od primijenjenih metoda.

U 24 dvorišta s ukupno 111 pasa (prosječno 4,6 pasa po dvorištu), barem jednom primijenjenom metodom, pozitivno su reagirala 34 psa. U većini pozitivnih dvorišta (19), zatečeno je više od jednog psa, a 5 vlasnika je posjedovalo samo jednog psa.

Međutim, usporedivši dvorišta sa samo jednim psom i ona s više pasa, Hi - kvadrat testom dobili smo vrijednosti za distribuciju seropozitivnosti $p=0,4261$, za PCR pozitivnost Fisher exact testom $p=0,0631$ te za istodobno seropozitivnost i PCR pozitivnost $p=0,1896$, stoga nismo utvrdili da povećanje broja pasa u dvorištu ima utjecaj na pojavnost seropozitivnog niti PCR pozitivnog nalaza.

U 13 dvorišta u kojima je zatečeno 2 i više pasa, otkriveno je 15 pasa pozitivnih i serološkim i molekularnim metodama (1,15 pasa po dvorištu). Samo u jednom od navedenih dvorišta otkrivena su 3 pozitivna psa dok je u preostalih 12 pozitivan bio samo po 1 pas. Ukoliko se promatra samo broj seropozitivnih pasa (25 pasa u 17 dvorišta) dobivamo 1,47 pozitivnih pasa po dvorištu. Broj pozitivnih molekularnim metodama (19 pasa u 16 dvorišta) iznosi 1,18 pasa po dvorištu.

Razmjerno mali broj invadiranih pasa po pozitivnom dvorištu podudara se s rezultatima koje je zabilježila ŽIVIČNJAK (2004.). Ova pojava može se objasniti na više različitih načina: moguće je da psi nisu invadirani u dvorištima u kojima smo ih zatekli, i da u njima nema uvjeta za širenje uzročnika (nema vektora), ili se radi o različitoj prijemčivosti i rezistenciji dijela populacije pasa. Moguće je također da je dio pasa bio invadiran te zbog pojave kliničkih simptoma (zaostajanja u lovnu i sl.), uklonjen od strane vlasnika.

Uočena pojava ne ide u prilog teorijama o prijenosu uzročnika bez posredstva papatača. Takvi načini prijenosa uzročnika vjerojatno imaju neznatnu ulogu u epidemiologiji lišmanioze (BANETH i sur., 2008.).

Primjenom Hi – kvadrat testa nije utvrđena povezanost rezultata seroloških i molekularnih metoda sa spolom pasa. Univarijantnom statističkom analizom utvrđeno je da su rezultati pojedinih testova statistički povezani s dobi. Općenito, vjerojatnost da će životinje starije dobne skupine biti pozitivne nekim od primijenjenih testova, bila je veća i statistički značajna u usporedbi sa mlađom skupinom. Mogućnost invadiranja raste ukoliko je pas izložen većem broju sezona aktivnosti papatača.

6.5. Rezultati primijenjenih seroloških i molekularnih testova

Najveći broj pozitivnih rezultata polučio je imunoenzimni test (ELISA). Dvadeset i pet pozitivnih pasa ukazuje na visoku osjetljivost ove metode. Četrnaest od ovih pasa dalo je pozitivan rezultat barem jednom molekularnom (PCR) metodom.

Međutim, čak 11 ELISA pozitivnih uzoraka reagiralo je negativno svim ostalim metodama (44%), stoga je vrlo upitna specifičnost ove metode. Podudarnost rezultata ELISA testa s rezultatima ostalih seroloških testova općenito je slaba, dok je podudarnost s kDNA i nested PCR testovima umjerena. Zbog visoke osjetljivosti smatramo je metodom odabira za primjenu u prvoj fazi praćenja, odnosno za trijažu, posebice u područjima koja su smatrana slobodnim od lišmanioze.

Testom neizravne imunofluorescencije (IFAT) otkrili smo 5 pozitivnih pasa. Razvidna je niža osjetljivost ovog testa, ali i vrlo visoka specifičnost. Rezultati se savršeno podudaraju s onima Leishmania Dipstick rK39 testa, a umjereni s rezultatima većine drugih testova. Zbog činjenice da se radi o kvantitativnom testu, nezamjenjiv je za pretrage serijskih razrjeđenja seruma tijekom kliničkog praćenja uspješnosti liječenja, a zbog visoke specifičnosti metoda je odabira za praćenje tijekom druge faze epizootiološkog istraživanja.

SNAP IDEXX Canine Leishmania Antibody Test Kit, otkrio je 11 seropozitivnih pasa od kojih je 9 pozitivno i primjenom nekog od PCR testova, dok su 2 uzorka negativna svim ostalim metodama. Specifičnost ovog testa je upitna, dok su mu prednosti jednostavno izvođenje te brzo dobivanje rezultata na terenu iz uzoraka pune krvi. Podudarnost s rezultatima ostalih seroloških testova općenito je umjerena ili slaba, dok je podudarnost s kDNA i nested PCR testovima umjerena.

Leishmania Dipstick rK39 testom dobiveni su rezultati identični onima IFAT testa, s kojim se u potpunosti podudara. Osjetljivost mu je slabija, ali je vrlo specifičan. Zbog niže osjetljivosti, ali i relativno visoke cijene, ovaj test nam se nije pokazao prikladnim za masovnija testiranja, ali je zbog visoke specifičnosti prikladan za drugu fazu trijaže. Svih 5 uzoraka pozitivnih ovim testom, pozitivno je IFAT – om, ELISA-om te s 2 PCR metode. Podudarnost s ostalim testovima je umjerena.

ITS-1 PCR (internal transcribed spacer 1 ili unutarnja prepisujuća razmaknica) Ovom molekularnom metodom utvrđeni su elementi lišmanijskog genoma u samo 2 psa. Osjetljivost testa se pokazala slabom, a specifičnost visoka (2 pozitivna uzorka potvrđena su sa svim ostalim metodama). U nekim istraživanjima lišmanioze kod ljudi se ova metoda pokazala vrlo pouzdanom (HARMS i sur., 2003). U našem istraživanju, podudarnost s rezultatima IFAT i Leishmania Dipstick rK39 testova bila je umjerena, dok je podudarnost s ostalim testovima bila slaba. Zbog vrlo niske osjetljivosti ova metoda se pokazala nepouzdanom za primjenu u bilo kojoj fazi praćenja.

Kinetoplastna DNK (kDNA) dokazana je u 18 uzoraka krvi od kojih su 3 negativna svim ostalim metodama. Osjetljivost metode je visoka a specifičnost nešto slabija.

Podudarnost rezultata ovog testa s ostalim testovima je umjerena, osim s ITS-1 PCR-om, s čijim rezultatima je podudarnost slaba. Zbog visoke osjetljivosti smatramo je metodom odabira za prvu fazu, odnosno trijažu, idealno kao dokaz širenja s mogućnošću rane detekcije, ali i za praćenje ishoda liječenja, te dokaza uzročnika kod klinički bolesnih seronegativnih pasa (i ljudi).

Nested PCR metodom dobiveno je 12 pozitivnih rezultata od kojih je 9 pozitivno i s bar jednom od preostale 2 molekularne metode, a preostala 3 su pozitivna ELISA-om. Osjetljivost i specifičnost metode je visoka. Podudarnost rezultata ovog testa s rezultatima ostalih testova

je umjerena, osim s ITS-1 PCR-om s čijim je rezultatima podudarnost slaba. Prikazana svojstva čine ovu metodu prikladnom za uporabu tijekom praćenja.

MOREIRA i sur., (2007.), su usporedili parazitološke, imunološke i molekularne metode. Studija je provedena na 89 naizgled zdravih pasa kod kojih su lišmanije izravno parazitološki dokazane u razmascima punktata limfnih čvorova i/ili su ELISA testom bili serološki pozitivni na lišmaniozu. Utvrđene su osjetljivosti ELISA testa 95,65% i izravne imunofluorescencije 73,91 %. Specifičnost za obje metode iznosila je 100 %.

U istraživanjima (EVANS i sur., 1990; MANCIANTI i sur., 1995.), ELISA je pokazala veću osjetljivost i specifičnost u usporedbi s IFAT.

E.M. LEMOS i sur., (2008.), usporedili su svojstva komercijalnog imunokromatografskog kvalitativnog rK39 Dipstick testa (Kalazar DetectTM) za detekciju antilišmanijskih protutijela (*L.chagasi*) u pasa bez simptoma lišmanioze. Rezultati su uspoređeni sa onima dobivenim ELISA testom. rK39 test pri tom je pokazao osjetljivost 75 %, a ELISA 94%. Specifičnost za obje metode iznosila je 100 %.

OTRANTO i sur., (2009), usporedili su najčešće korištene dijagnostičke metode tijekom longitudinalnih studija na invadiranim asimptomatskim psima u enzootskom području Italije. Istraživanje je bilo usredotočeno na otkrivanje ranih invazija, pri čemu je na prva 2 testiranja (studen 2005. i ožujak 2006. g.), ELISA pokazala veću osjetljivost u odnosu na IFAT i rK39 dipstick test, dok u trećem testiranju (ožujak 2007. g.) između testova nije bilo statistički značajnih razlika. Međutim, znatno veći postotak pozitivnih ELISA rezultata je zabilježen u pasa istodobno seropozitivnih na *Ehrlichia canis*, što ukazuje na moguće unakrižne reakcije i lažno pozitivne rezultate na lišmaniozu, iako je moguće i da su antilišmanijska protutijela, detektibilna samo ELISA testom davala lažno pozitivne reakcije na *Erlitchiu canis* IFAT testom. Navedeni rezultati su u suglasju s našim rezultatima u pogledu većeg broja pozitivnih rezultata dobivenih ELISA testom.

Periferni biološki uzorci, poput pune krvi, jednostavno se uzorkuju i umnogome su prihvatljiviji vlasnicima pasa od znatno invazivnijih metoda biopsije koštane srži ili limfnih čvorova. Uzorak pune krvi na filter papiru (eluat) za PCR se može također koristiti kao nadopuna serološkim rezultatima (MAIA i sur., 2007.).

Vrijednost pretraživanja uzorka pune krvi ipak ovisi o trajanju, konstantnosti i intenzitetu parazitemije, koja je u pasa još uvijek umnogome nepoznanica (LACHAUD i sur., 2002.).

Zbog toga postoji mogućnost dobivanja lažno negativnih rezultata, pogotovo kod subklinički invadiranih pasa. S druge pak strane, za vrijeme sezone prijenosa uzročnika, mogu se pojaviti lažno pozitivni rezultati zbog kontakta s uzročnikom ili prolazne invazije.

Konačno, klasičnim PCR metodama ne dokazujemo intaktnog uzročnika, nego njegovu umnoženu DNK, stoga rezultat ne odražava težinu invazije niti stadij bolesti (MOREIRA i sur., 2007.).

Jedan negativni PCR rezultat kod klinički sumnjivih pasa nije dovoljan da bi se otklonila mogućnost invadiranosti životinje. Studije vrednovanja PCR rezultata iz različitih tkiva invadiranih pasa pokazale su varijabilne i ponekad proturječne rezultate (BANETH i AROCH, 2008.). Široki raspon osjetljivosti, uočen između različitih studija, može se objasniti heterogenom distribucijom parazita u raznim tkivima i različitim brojem parazita u pojedinim organima, što je povezano s tropizmom lišmanijskog soja i lokalnim imunosnim odgovorom (MAIA i sur., 2007.).

6.6. Odabir dijagnostičkih metoda za provođenje praćenja

Klinička dijagnostika lišmanioze je razmjerno jednostavna u pasa s razvijenom kliničkom slikom bolesti, jer zahtijeva samo upotrebu visoko specifične metode. Znatno složenija je dijagnostika u subklinički invadiranih pasa ili pasa s diskretnim kliničkim simptomima.

U takvim slučajevima, kao i za epidemiološke studije, nužan je test s visokom osjetljivosti. Upotrebljivost svakog testa ovisiti će o dijagnostičkoj namjeni kao što su: potvrda bolesti u pasa s kliničkim simptomima, pretraživanje pasa koji su bili u kontaktu s invadiranim životinjama, epidemiološka istraživanja, pretraživanje pasa prije uvoza u ne enzootska područja/zemlje ili pretraživanja radi eliminacije invadiranih pasa iz populacije.

Za svaku od ovih namjena treba izabrati test prikladan u pogledu stupnja osjetljivosti i specifičnosti, cijene i jednostavnosti izvođenja (GOMES i sur., 2008.). Jednaku važnost treba dati i učinkovitosti odabranog laboratorijskog testa i odabiru biološkog materijala.

Idealan dijagnostički test kojim bi se otkrivali svi invadirani psi, a neinvadirani davali negativan rezultat, ne postoji. Dijagnostički biljezi kod invazije lišmanijama postaju pozitivni određenim redom i za objektivnu dijagnostiku nužna je primjena više različitih metoda.

Jedna od najvažnijih mjera suzbijanja lišmanioze trebala bi biti nadzor nad rezervoarom uzročnika primjenom optimalnog dijagnostičkog protokola. Epizootiološko praćenje, podrazumijeva rutinsko prikupljanje, analiziranje i davanje podataka o pojavi neke bolesti u populaciji.

Primjenom multiplog trijažnog testiranja, koje podrazumijeva izvođenje nekoliko testova istovremeno, postiglo bi se preliminarno otkrivanje subklinički invadiranih pasa. Pas koji bilo kojim testom pokaže pozitivan rezultat, smatrao bi se pozitivnim, dok pas koji niti jednim testom nije pozitivan bi se smatrao negativnim na lišmaniozu. Cilj ovakvog pristupa je povećanje ukupne osjetljivosti testiranja, iako se smanjuje specifičnost.

Lišmanioza kao bolest koja ima visoku učestalost predsimptomatske faze, ispunjava epizootiološke kriterije za uvođenje sustavnog testiranja.

Pored toga, predsimptomatska faza (inkubacija) lišmanioze je obično vrlo duga i velika je vjerojatnost da će nakon trijažnog testiranja invadirana životinja biti otkrivena.

Kriteriji za trijažne testove nalažu da isti moraju imati odgovarajuću točnost koja predstavlja vjerojatnost da će pas biti ispravno razvrstan temeljem nekog testa, te osjetljivost i specifičnost (HENNEKENS i BURNING, 1987.). U pravilu se osjetljivost i specifičnost testa određuje na populaciji s tipičnim spektrom bolesti, te u laboratorijskim uvjetima pomoću pokušnih infekcija. Određivanje osjetljivosti i specifičnosti pojedinih testova moguće je uspoređivanjem rezultata sa „zlatnim standardom“.

Za trijažna testiranja je važna i tzv. „prediktivna“ vrijednost, koja može biti pozitivna i predstavlja vjerojatnost da pas koji je trijažnim testom označen pozitivnim zaista invadiran, ili negativna i predstavlja vjerojatnost da pas koji je označen negativnim zaista nije invadiran.

Pouzdanost trijažnog testa podrazumijeva da test uzastopnim ponavljanjem istih uzoraka opetovano daje identične rezultate.

Navedene kriterije postigli bismo u prvoj fazi, primjenom visoko osjetljivih metoda, kakvima su se u našem istraživanju pokazali imunoenzimni test (ELISA) kao jednostavnija i jeftinija metoda, ali i kDNA PCR kao posebno prikladna trijažna metoda u području gdje nema podataka o lišmaniozi. Lažne pozitivne reaktore bi smo eliminirali u drugoj fazi, upotrebom seroloških metoda visoke specifičnosti poput IFAT testa ili Leishmania dipstick rK39 brzog imunokromatografskog testa, te molekularnom metodom ugniježđena (*nested*) PCR.

IFAT je kvantitativna metoda, te je stoga nezamjenjiva za serološke pretrage u serijskim razrjeđenjima. Tijekom uspješnog liječenja obično dolazi do pada titra protutijela u serumu, a dinamiku titra protutijela važno je pratiti i nakon prestanka liječenja, pa IFAT testom dobivamo korisne podatke o kretanju imunosnog odgovora kod individualnog praćenja životinja (OTRANTO i sur., 2009.). Takva testiranja poglavito se provode u sklopu kliničkog praćenja, koji podrazumijeva stalni nadzor pasa tijekom trajanja bolesti. U kontekstu

lišmanioze to obično podrazumijeva procjenu odgovora na poduzeto liječenje kod klinički bolesnih pasa (ROURA i sur., 2013.).

SNAP imunoenzimni test prikladan je za masovnija trijažna testiranja u kojima nije nužno određivanje titra protutijela; praktičan je za izvođenje u terenskim uvjetima, ali je relativno skup.

Primjena ovakvog programa trijaže, zasigurno bi pridonijela ranom otkrivanju znatnog broja invadiranih pasa prije pojave kliničkih simptoma, pa čak i prije pojave serokonverzije.

6.7. Mjere koje bi trebalo poduzeti u svrhu kontrole lišmanioze pasa

Lišmanioza pasa se općenito može širiti uvođenjem bolesnih ili subklinički invadiranih pasa u područje gdje već postoji vektor, ili širenjem vektora. Dosad provedenim entomološkim istraživanjima sa sigurnošću je utvrđeno prisustvo vektora (podrod *Larroussius*) na području srednje i južne Dalmacije (BOSNIĆ i sur. 2006.), ali i u Hrvatskom primorju (otok Krk) te Baranji (ŽIVIČNJAK, usmeno priopćenje).

U Hrvatskoj stoga postoji realna opasnost od širenja lišmanioze pasa prema sjeveru uz obalu i prema unutrašnjosti, kao što se dogodilo u susjednoj Italiji (MAROLI i sur., 2008; FERROGLIO i sur., 2005; MOROSETTI i sur., 2009.). Program bi trebalo provoditi u enzootskom i graničnom području.

Iako lišmaniozu nije moguće u potpunosti suzbiti, u svrhu kontrole bolesti, nužno je provoditi sustavne mjere, kako bi se otkrivala nova žarišta lišmanioze, te da bi se ustanovilo da li je vektor prisutan u ostalim dijelovima priobalja i unutrašnjosti (ŽIVIČNJAK i sur., 2008.). Takve bi mjere uključivale praćenje vektora i rezervoara, koje bi se provodilo entomološkim ispitivanjima te serološkim i parazitološkim pretragama, izdvajanjem i uzgojem uzročnika *in vitro* i umnožavanjem njegove DNK (PCR). Primjenom visoko osjetljivih PCR metoda, povećava se vjerojatnost otkrivanja subklinički invadiranih i serološki negativnih pasa, budući da se samo procjenom seroprevalencije može podcijeniti stupanj raširenosti invazije.

Učinkovit program bi trebao dovesti do smanjenja broja invadiranih pasa, poboljšanja kvalitete života invadiranih pasa, odnosno sprečavanje razvoja klinički manifestne bolesti, povećanja vremena preživljavanja, opadanja letaliteta, ali i smanjenje učestalosti lišmanioze kod ljudi.

Uz navedne mjere, jednako važno bi bilo da kinološke i lovačke udruge potiču svoje članove da prije prodaje ili kupovine psa obave relevantno serološko i PCR testiranje i dobiju negativan nalaz na lišmaniozu. Uvođenje eutanazije kao obavezne mjere suzbijanja nema učinka. Ukoliko se vlasnik odluči liječiti psa, trebalo bi nadzirati tijek liječenja, provoditi kontrolu titra i onemogućiti preprodaju. Potrebno je provoditi mjere dezinsekcije potencijalnih staništa posrednika i primjene repelenata na svim psima u sezoni aktivnosti vektora. Najveći problem u organizaciji testiranja i općenito u suzbijanju lišmanioze su cijena pretrage te nedovoljna educiranost vlasnika pasa, pa i slabija informiranost nekih veterinara (ŽIVIČNJAK i sur., 2008.).

Podaci o širenju enzootske lišmanioze pasa su nužni u svrhu određivanja učinkovitih mjera za sprječavanje zoonotske lišmanioze. Suzbijanje bolesti kod ljudi izravno ovisi o učinkovitom suzbijanju lišmanioze pasa i mjerama usmjerenim prema populaciji vektora.

7. ZAKLJUČCI

1. Definicija učestalosti lišmanioze pasa ovisi o području uzorkovanja, vremenskom periodu uzorkovanja i metodi dokazivanja samog uzročnika ili protutijela.
2. Istraživanja kojima se istovremeno uspoređuje osjetljivost seroloških i molekularnih metoda su malobrojna a provođena su na malim skupinama pokušno invadiranih pasa ili usporedbom relativno malog broja metoda.
3. Provedeno je prvo istraživanje kojima se istovremeno uspoređuje osjetljivost četiri serološke i tri molekularne metode u eksponiranoj populaciji (psi iz enzootskog područja).
4. Dokazano je da korištenje samo jedne metode (molekularne ili serološke) ili promjena slijeda više metoda može dati pogrešne (lažno pozitivne ili lažno negativne) rezultate učestalosti i proširenosti lišmanioze u enzootskim i graničnim područjima.
5. Način držanja, odnosno veći broj pasa u uzgoju ne povećava vjerojatnost nastanka žarišta.
6. Prijenos uzročnika izravnim kontaktom je upitan i naše je mišljenje da nema epizootiološki značaj.
7. Dijagnostikom koja se svodi na primjenu jedne kvalitativne serološke metode, a kakva se poglavito provodi u ambulantama male prakse i drugim veterinarskim organizacijama u Dalmaciji, zasigurno ostaje neotkriven veliki broj invadiranih pasa.
8. U enzootskom je području razvidna nužnost kombinacije nekoliko metoda praćenja određenim slijedom, što je po prvi puta dokazano ovim istraživanjem, i daje mu znanstvenu originalnost.

8. POPIS LITERATURE

ALONSO, F., P. GIMÉNEZ, M. MANCHÓN, R. RUIZ de YBÁÑEZ, E. BERRIATUA (2009): Geographical Variation and Factors associated to seroprevalence of canine leishmaniosis in an endemic Mediterranean area. *Zoonoses Public Health.* 57 (2010), 318-328.

ALVAR, J., CANAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., NIETO, J. (2004): Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.

ALVAR, J., S. YACTAYO, C. BERN (2006): Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 22, 552-557.

ANDERSON, C.L., C. CHAUDHURY, J. KIM, C.L. BRONSON, M.A. WANI, S. MOHANTY (2006): Perspective - FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol.* 27, 343–348.

ANONYMOUS (2003): Croatian National Institute Of Public Health. *Lišmanijaza u Hrvatskoj. Epidemiološki vjesnik* 9,3.

ASHFORD, D.A., M. BOZZA, M. FREIRE, J.C. MIRANDA, I. SHERLOCK, C. EULALIO, U. LOPES, O. FERNANDES, W. DEGRAVE, R.H. BARKER, R. BADARO & J.R. DAVID (1995): Comparision of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 251-255.

ASHFORD, R.W. (1996): Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14, 523–532.

ASHFORD, R.W. (2000): The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281.

BALLART, C., M.M. ALCOVER, A. PICADO, J. NIETO, S. CASTILLEJO, M. PORTÚS, M. GÁLLEGOS (2013): First survey on canine leishmaniosis in a non classical area of the

disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on veterinary questionnaire and cross-sectional study. Prev. Vet. Med. 109, 116-127.

BANETH, G., I. AROCH. Canine leishmaniasis - a diagnostic and clinical challenge (2008): Vet. J. 175, 14-15.

BANETH, G., A.F. KOUTINAS, L. SOLANO - GALLEG, P. BOURDEAU, L. FERRER (2008): Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol. 24, 324-330.

BAÑULS, A.L., M. HIDE, F. PRUGNOLLE (2007): Adv. Parasit. Vol. 64, 2-53.

BATES, P.A (2007): Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int. Journ. for Parasitol. 37, 1097-1106.

BERRAHAL, F., C. MARY, M. ROZE, A. BERENGER, K. ESCOFFIER, D. LAMOUROUX, S. DUNAN (1996): Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55, 273–277.

BOARINO, A., A. SCALONE, L. GRADONI, E. FERROGLIO, F. VITALE, R. ZANATTA, M.G. GIUFFRIDA, S. ROSATI (2005): Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12, 647–653.

BOGGIATO, P.M., K.N. GIBSON-CORLEY, K. METZ, J.M. GALLUP, J.M. HOSTETTER, K. MULLIN, C.A. PETERSEN (2011): Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. PLoS Negl. Trop. Dis., 5 (4).

BOSNIĆ, S., L. GRADONI, C . KHOURY, M. MAROLI (2006): A review of leishmaniasis in Dalmatia (Croatia) and results from recent surveys on phlebotomine sandflies in three southern counties; Science Direct, Acta Trop. 99, 42-49.

BOTTERO, E., M. POGGI, M. VIGLIONE (2006): Lesioni papulari indotte da *Leishmania* spp in 8 cani giovani. Veterinaria 1, 33-36.

CABRAL, M., J.E. O'GRADY, S. GOMES, J.C. SOUSA, H. THOMPSON, J. ALEXANDER (1998): The immunology of canine leishmaniosis; strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. Vet. Parasitol. 76, 173-180.

CAMPINO, L., G. SANTOS-GOMES, M. J. RICA CAPELA, S. CORTES, P. ABRANCHES (2000): Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. Vet. Parasitol. 92, 269-275.

CAMPINO, L. (2002): Canine reservoirs and leishmaniasis: Epidemiology and disease. In: Farrel J.P. (Ed.), World Class Parasites: Leishmania vol. 4.. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, pp. 45-57.

CARDOSO, L., H.D.F.H. SCHALLIG, A. CORDEIRO-DA-SILVA, M. CABRAL, J.M. ALUNDA, M. RODRIGUES (2007): Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. Vet Immunol. Immunopathol. 117, 35-41

CARVALHO, L.P., M. SOTO, S. JERONIMO, B. DONDJI, O. BACELLAR, V. LUZ, G.O. ORGE, C. ALONSO, A.R. JESUS, E.M. CARVALHO (2003): Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. Microbes Infect. 5: 7-12.

CIARAMELLA, P., G. OLIVA, R. DE LUNA, L. GRADONI, R. AMBROSIO, L. CORTESE, A. SCALONE, A. PERSECHINO (1997): A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet. Rec. 22, 539-543.

COSTA, F.A., H. GOTO, L.C. SALDANHA, S.M. SILVA, I.L. SINHORINI, T.C. SILVA, J.L. GUERRA (2003): Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. Vet. Pathol. 40, 677-684.

COTRAN, R.S., V. KUMAR & T. COLLINS (1999): Robbins' pathologic basis of disease. W.B.S. Saunders Company, Philadelphia.

COUTINHO, M.T., L.L. BUENO, A. STERZIK, R.T. FUJIWARA, J.R. BOTELHO, M. DE MARIA, O. GENARO, P.M. LINARDI (2005): Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 128, 149-155.

COUTINHO, M.T., P.M. LINARDI (2007): Can fleas from dogs infected canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? Vet. Parasitol. 147, 320-325.

CVJETANOVIĆ, V. (1953): „O klinici i epizootiologiji lišmanioze pasa u gradu i kotaru Dubrovnik“. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb 1953.

DANTAS-TORRES, F., S.P. BRANDÃO-FILHO (2006): Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 48, 151-156.

DANTAS-TORRES, F., M.E. FELINTO de BRITO, S.P. BRANDÃO-FILHO (2006): Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. Vet. Parasitol. 140, 54-60.

DANTAS-TORRES, F. (2007): The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Vet. Parasitol. 149, 139-146.

DAVIDSON, R.N. (1999): Leishmaniasis in humans, with particular reference to leishmaniasis with a canine reservoir Canine Leishmaniasis: an update (Ed. R. Killick-Kendrick). Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona (Sitges), 28-31 January 1999, 72-77.

DENEROLLE, P., G. BOURDOISEAU, (1999): Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). J. Vet. Intern. Med. 13, 413-415.

DEPLAZES, P., N.C. SMITH, P. ARNOLD, H.LUTZ & J. ECKERT (1995): Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. Parasite Immunol. 17, 451-458.

DEREURE, J., F. PRATLONG, J.P. DEDET (1999): Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. U: Canine Leishmaniasis: an update (Ed. R. Killick-Kendrick). Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona (Sitges), 28-31 January. Pp 18-25.

DESJEUX, P. (2004): Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microb. 27, 305–318.

DUJARDIN, J.C., L. CAMPINO, C. CAÑAVATE, J.P. DEDET, L. GRADONI, K. SOTERIADOU, A. MAZERIS, Y. OZBEL, M. BOELAERT (2008): Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. Emerg. Infect. Dis. 14, 1013-1018.

DUPREY, Z.H., F.J. STEURER, J.A. ROONEY, L.V. KIRCHOFF, J.E. JACKSON, E.D. ROWTON, P.M. SCHANTZ (2006): Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. Emerg. Infect. Dis. 12, 440-446.

DYE, C., R. KILICK-KENDRICK, M.M. VITUTIA, R. WALTON, M. KILICK - KENDRICK, A.E. HARITH, M.W. GUY, M.C. CANAVATE, G. HASIBEDER (1992): Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. Parasitology, 105, 35-41.

DYE, C., E. VIDOR & J. DEREURE (1993): Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. Epidemiol. Infect. 110, 647-656.

EVANS, T.G., I.A.B. VASCONCELOS, J.W. LIMA, J.M. TEIXEIRA, I.T. MCAULLIFE , U.G. LOPES, R.D. PEARSON, A.W. VASCONCELOS (1990): Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. Am. J. Trop. Med. Hyg. 42, 118–123.

FERREIRA EDE, C., M. DE LANA, M. CARNEIRO, A.B. REIS, D.V. PAES, E.S. DA SILVA, H. SCHALLIG, C.M. GONTIJO (2007): Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* 146, 235–241.

FERRER, L., R. RABANAL, D. FONDEVILA, J.A. RAMOS, M. DOMINGO (1988): Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. Small. Anim. Pract.* 29, 381-388.

FERRER, L., B. JUANOLA, J.A. RAMOS & A. RAMIS (1991): Chronic colitis due to Leishmania infection in two dogs. *Vet. Pathol.* 28, 342-343.

FERRER, L., M.J. AISA, X. ROURA, M. PORTUS (1995): Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Rec.* 136, 514–516.

FERRER, L.M. (1999): Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick, R. (Ed.), *Canine leishmaniasis: An update*. Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona (Sitges), 28-31 January, pp.6-10.

FERRER, L. (2002): The pathology of canine leishmaniasis. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain 2002, 21-24.

FERROGLIO, E., M. MAROLI, S. GASTALDO, W. MIGNONE, L. ROSSI (2005): Canine leishmaniasis, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1618-1619.

FERROGLIO, E., F. VITALE (2006): Diagnosis of leishmaniosis: between old doubts and new uncertainties. *Vet. Res. Commun.* 30, 35–38.

FISA, R., M. GÁLLEGO, S. CASTILLEJO, M.J. AISA, T. SERRA, C. RIERA, J. CARRIÓN, J. GÁLLEGO, M. PORTÚS (1999): Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87-97.

FISA, R., C. RIERA, M. GÁLLEGO, J. MANUBENS, M. PORTÚS (2001): Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet. Parasitol.* 99, 105-111.

FONT, A., C. GINES, M. JOSEP, J. MASCORT (1994): Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog. JAVMA; 7, 1043-1044.

FRANCINO, O., L. ALTET, E. SANCHEZ - ROBERT, A. RODRIGUEZ, L. SOLANO - GALLEGOS, J. ALBEROLA, L. FERRER, A. SANCHEZ, X. ROURA (2006): Advantages of realtime PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet. Parasitol. 137, 214-221.

GASIM, S., T.G. THEANDER, A.M. ELHASSAN (2000): High levels of C-reactive protein in the peripheral blood during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post kala-azar dermal leishmaniasis. Acta Trop. 75, 35-38.

GIAMARELLOU, H. (2000): AIDS and the Skin: Parasitic Diseases. Clin.Dermatol. 18, 433-439.

GOMES, Y.M., M. PAIVA CAVALCANTI, R.A. LIRA, F.G. ABATH, L.C. ALVES (2008): Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. Vet. J. 175, 45-52.

GRADONI, L. (1999): Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. In: Killick-Kendrick, R. (Ed.), Canine Leishmaniasis: An Update. Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden, pp. 32-39.

GRADONI, L. (2001): An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine Leishmania vaccine. Vet. Parasitol. 100, 87-103.

GRADONI, L. (2002): The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain -2002. Pp 7-14

GRIMM, F., M. GESSLER, L. JENNI (1993): Aspects of sandfly biology in southern Switzerland. Med. Vet. Entomol. 7, 170-176.

HAMERSHEH, O., A. NASEREDDIN, S. DAMAI, S. SAWALHA, H. AL-JAWABREH, K. AZMI, A. AMRO, S. EREGAT, Z. ABDEEN, A. AL-JAWBREH (2012): Serological and molecular survey of Leishmania parasites in apparently healthy dogs in the West Bank, Palestine. *Parasit. Vectors* 31, 5:183 <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/183>

HANDMAN, E. (2000): Cell Biology of Leishmania. U: *Adv. Parasit.* vol. 44, eds. Baker, J.R., R. Muller, D. Rollinson; Academic Press. Pp 2-39.

HANDMAN, E. (2001): Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 229-243.

HARMS, G., G. SCHONIAN, H. FELDMEIER (2003): Leishmaniasis in Germany. *Emerg Infect. Dis.* 9, 872-875.

HENNEKENS, C.H., J.E. BURNING (1987): Epidemiology in medicine. Ed. S.L. Mayrent. Boston: Little, Brown. 1st ed. Pp. 301-303.

HERWALDT, B.L. (1999): Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.

HRVATSKI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO – Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2011. godinu. Web izdanje (2012): str.195.

http://www.hzjz.hr/publikacije/hzs_ljetopis/Ljetopis_Yearbook_HR_2011.

INIESTA, V., M. GARCIA ALONSO, I. MOLANO, C. MIRON, J. CARCELEN, I. CORRALIZA & C. GOMEZ NIETO (2001): Pathological and immunological changes in eyes and aqueous humour of Leishmania infantum infected dogs. Second World Congress on Leishmaniasis.

JACOB, D. (2008): Short communication on regional climate change scenarios and their possible use for impact studies on vector-borne diseases. *Parasitol. Res.* 103, 3-6.

KAFETZIS, D.A. (2003): An Overview of paediatric leishmaniasis. *J. Postgrad. Med* 49, 31-38.

KAMHAWI, S.(2000): The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect.* 2, 1765-1773.

KEENAN, C.M., L.D. HENDRICKS, L. LIGHTNER. & A.J. JOHNSON (1984b): Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. Pathology. *Vet. Pathol.* 21, 80-86.

KILLICK- KENDRICK ,R. (1999): The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279-289.

KILLICK-KENDRICK, R. (2002): The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. U: Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain. Pp. 57-68.

KOEHLER, K., M. STECHELE, U. HETZEL, M. DOMINGO, G. SCHÖNIAN, H. ZAHNER, E. BURKHARDT (2002): Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet.Parasitol.* 109, 9-17.

KOUTINAS, A.F., D.W. SCOTT, V. KONTOS, S. LEKKAS (1992): Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Vet. Dermatol.* 3, 121–130.

KOUTINAS, A.F., Z.S. POLIZOPOULOU, M.N. SARIDOMICHELAKIS, D. ARGYRIADIS, A. FYTIANOU, K.G. PLEVRAKI (1999): Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 376–383.

KUHLS, K., M.Z. ALAM, E. CUPOLILLO, G.E.M. FERREIRA, I.L. MAURICIO, R. ODDONE, M.D. FELICIANGELI, T. WIRTH, M.A. MILES, G. SCHÖNIAN (2011): Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals low Heterogeneity among Populations and its Recent Old World Origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (6): e1155. Doi:10.1371/journal.pntd.0001155

LACHAUD, L., E. CHABBERT, P. DUBESSAY, J. DEREURE, J. LAMOTHE, J.P. DEDET, P. BASTIEN (2002): Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniosis and the detection of asymptomatic carriers. Parasitology 125, 197-207.

LAINSON, R. (1982): Leishmaniasis. U: CRC Handbook Series in Zoonoses. Ed. Steele, J.H. Section C: Parasitic Zoonoses Volume I. Eds. Jacobs, L., Arambulo, P. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. Pp. 41-103.

LAINSON, R., J.J. SHAW (1998): New World leishmaniasis - The Neotropical Leishmania species. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Vol. 5 (F.E.G. Cox, J.P. Kreier and V. Wakelin, eds), London: Hodder Arnold. pp. 241-266.

LAURELLE - MAGALON, C., I. TOGA (1996): Un cas de leishmaniose féline. Pract Med Chir Animal Comp 31, 261-266.

LAURENTI, M.D., C.N. ROSSIB, V.L.R. da MATTA, T.Y. TOMOKANE, C. E.PEREIRA CORBETTA, N.F. COSTA SECUNDINOC, P.F. PAULOCCI PIMENTAC, M. MARCONDES (2013): Asymptomatic dogs are highly competent to transmit Leishmania (Leishmania) infantum chagasi to the natural vector. Vet.Parasitol.(2013), Article in press <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>

LE FICHOUX, Y., J.F. QUARANTA, J.P. AUFEUVRE, A. LELIEVRE, P. MARTY, I. SUFFIA, D. ROUSSEAU, J. KUBAR (1999): Occurrence of Leishmania infantum Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France. J. Clin. Microbiol. 37, 1953-1957.

LEMOS, E.M., M.D. LAURENTI, M.A.B. MOREIRA, A.B. REIS, R.C. GIUNCHETTI, S. RAYCHAUDHURI, R. DIETZE (2008): Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic test (Kalazar DetectTM) in dogs with and without signs of disease. Acta Trop. 107, 205-207.

LOPEZ, R., R. LUCENA, M. NOVALES, P.J. GINEL, E. MARTIN, J.M. MOLLEDA (1996): Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. J.Vet.Med. 43, 469-474.

MAIA, C., J. RAMADA, J. CRISTÓVÃO, L. CAMPINO (2007): Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. Vet. J., doi: 10.1016/j.tvjl.2007.08.009.

MAIA, C., L. CAMPINO (2008): Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet. Parasitol. 158, 274–287.

MAIA, C., J. RAMADA, J.M. CRISTÓVÃO, L. GONCALVES, L. CAMPINO (2009): Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. Vet. J. 179, 142–144.

MANCANTI, F., M.L. FALCONE, C., GIANNELLI, A. POLI (1995): Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. Vet. Parasitol. 59, 13–21.

MANCANTI, F., F. PEDONESE, A. POLI (1996): Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescent assay. Vet. Parasitol. 65, 1–9.

MANNA, L., F. VITALE, S. REALE, S. CARACAPPA, L.M. PAVONE, R.D. MORE *et al* (2004): Comparison of different tissue sampling for PCR – based diagnosis and follow up of canine visceral leishmaniosis. Vet. Parasitol. 125, 251-262.

MANNA, L., S. REALE, F. VITALE, E. PICILLO, L.M. PAVONE, A.E. GRAVINO (2008a): Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. Vet. J. 177, 279–282.

MANNA, L., F. VITALE, S. REALE, E. PICILLO, G. NEGLIA, F. VESCIANO, A.E. GRAVINO (2008b): Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. Vet. J. 182 (3), 441-5.

MAROLI, M., L. ROSSI, R. BALDELLI, G. CAPELLI, E. FERROGLIO, C. GENCHI, M. GRAMMICIA, M. MORTARINO, M. PIETROBELLINI, L. GRADONI (2008): The

northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health* 13, 256-264.

MARTÍNEZ, V., J.QUILEZ, A. SANCHEZ, X. ROURA, O. FRANCINO, L. ALTET (2011): Canine leishmaniasis: The key points for qPCR result interpretation. *Parasites and Vectors* 13, 57-61.

MARTINKOVIĆ, F., D. LUKAS, A. MARINCULIĆ, T. ŽIVIČNJAK, P. RAMADAN, N. DŽAKULA, D. STOJČEVIĆ (2001): Epidemiological Investigation of Leishmaniasis in Croatia. In: Abstract book. Croatian and Slovenian Symposium on Microbiology and Infectious Diseases: Zoonoses Today and Tomorrow. Plitvice.

MARTINKOVIĆ, F., A.MARINCULIĆ (2006): Antibodies against *Leishmania* cross-react with *Crithidia luciliae*: indirect immunofluorescence and Dot-ELISA study in dogs. *Parasitol.Res.* 4, 378-380.

MARQUARDT, W.C., R.S. DEMAREE, R.B. GRIEVE (2000): Parasitology and Vector Biology, 2nd edition, Academic Press, San Diego, California.

MATHIS, A. & P. DEPLAZES (1995): PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania spp.* In diagnostic samples from humans and dogs. *J.Clin.Microbiol.* 33, 1145-1149.

MAUËL, J.(1996): Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* 38, 1-51.

MENCKE, N. (2013): Future challenges for parasitology: Vector control and „One health“ in Europe. The veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 195, 256-271.

METTLER, M., F. GRIMM, G. CAPELLI, H. CAMP, P. DEPLAZES (2005): Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of

symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. J. Clin. Microbiol. 43, 5515–5519.

MIRÓ, G., L. CARDOSO, M.G. PENNISI, G. OLIVA, G. BANETH (2008): Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol. 24, 371–377.

MIRÓ, G., G. OLIVA, I. CRUZ, C. CANÁVATE, M. MORTARINO, C. VISCHER, P. BIANCIARDI (2009): Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. Vet. Dermatol. 20 (5-6), 397-404.

MIRÓ, G., R. GÁLVEZ, C. FRAILE, M.A. DESCALZO, R. MOLINA (2011): Infectivity to *Phlebotomus Perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. Parasit. Vectors 13, 52-56.

MOLLEDA, J.M., M. NOVALES, P.J. GINEL, A. FERNANDEZ, A. & R. LOPEZ (1999): Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniosis. Refu. Vet. 48, 173-178.

MOLINA, R., C. AMELA, J. NIETO, M. SAN - ANDRES, F. GONZALEZ, J.A. CASTILLO, J. ALVAR (1994): Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 491-493.

MORENO, J., J. ALVAR (2002): Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol. 18, 399–405.

MOREIRA, M., M. LUVIZOTTO, J. GARCIA, C. CORBETT, M. LAURENTI (2007): Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet. Parasitol. 145, 245–252.

MOROSETTI, G., G. BONGIORNO, B. BERAN, A. SCALONE, J. MOSER, M. GRAMICCIA, L. GRADONI, M. MAROLI (2009): Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy. Geospat. Health 4, 103-115.

MURRAY, H. (2001): Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Ch.* 8, 2185-2197.

MURRAY, H.W., J.D. BERMAN, C.R. DAVIES and N.G. SARAVIA (2005): Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561–1577.

NAIFF, R.D., S. TALHARI and T.V. BARRETT (1988): Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 529-530.

NASEREDDIN, A., S. EREGAT, K. AZMI, G. BANETH, C.L. JAFFE, Z. ABDEEN (2006): Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *J. Parasitol.* 92, 178-183.

NAUCKE, T.J., C. SCHMITT (2004): Is leishmaniasis becoming endemic in Germany? *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 179-181.

NIETO, C.G., I. NAVARRETE, M.A. HABELA, F. SERRANO & E. REDONDO (1992): Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* 45, 33-47.

NOLI, C., S.T. AUXILIA (2005): Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.* 16, 213–232.

NUNES, C.M., A.K.K. DIAS, F.P. GOTTARDI, H.B. DE PAULA, M.A. AZEVEDO, V.M.F. LIMA *et al* (2007): Avaliacão da Reacão em Cadeia pela Polimerase para diagnostic da Leishmaniose Visceral em sangue de cães. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 16, 5-9

OLIVA, G., A. SCALONE, V. FOGLIA MANZILLO, M. GRAMICCIA, A. PAGANO, T. DI MUCCIO, L.GRADONI (2006): Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1318–1322.

OLIVA, G., X. ROURA, A. CROTTI, M. MAROLI, M. CASTAGNARO, L. GRADONI, G. LUBAS, S. PALTRINIERI, A. ZATELLI, E. ZINI (2010): Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 236, 1192-1198.

ORDEIX, L., L. SOLANO - GALLEGOS, D. FONDEVILA, L. FERRER, A. FONDATI (2005): Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. Vet. Dermatol. 16, 187-191.

OSORIO, L.E., C.M. CASTILLO, M.T. OCHOA (1998): Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania* (Viannia) panamensis in Colombia: clinical characteristics. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 49-52.

OTRANTO, D., P. PARADIES, D. de CAPRARIIS, D. STANNECK, G. TESTINI, F. GRIMM, P. DEPLAZES, G. CAPELLI (2009): Toward Diagnosing *Leishmania infantum* Infection in Asymptomatic Dogs in an Area Where Leishmaniasis Is Endemic. Clin. Vaccine Immunol. 16, 337-343.

OUMEISH YOUSSEF OUMEISH (1999): Cutaneous leishmaniasis: A historical perspective Clin. Dermatol. 17, 249-254.

OWENS, S.D., D.A. OAKLEY, K. MARRYOTT, W. HATCHETT, R. WALTON, T.J. NOLAN, A. NEWTON, F. STEURER, P. SCHANTZ, U. GIGER (2001): Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 219 (8), 1076-1083.

OZON, C., P. MARTY, F. PRATLONG, C. BRETON, M. BLEIN, A. LELIEVRE, P. HAAS (1998): Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. Vet. Parasitol. 75, 273-277.

PALATNIK - DE - SOUSA C.B., M.J. DAY, (2011): One Health: the Global Challenge of Epidemic and Endemic Leishmaniasis. Parasit. Vectors 4, 197.

PALTRINIERI, S., L. SOLANO-GALLEGO, A. FONDATI, G. LUBAS, L.GRADONI, M. CASTAGNARO, A. CROTTI, M. MAROLI, G. OLIVA, X. ROURA (2010): Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 236, 1184-1191.

PANGRAZIO, K.K., E.A.COSTA, S.P. AMARILLA, A.G.Cino,T.M. SILVA, T.A. PAIXAO, L.F. COSTA, E.G. DENGUES, A.A. DIAZ, R.L. SANTOS (2009): Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet. Parasitol.* 165(3-4), 327-331.

PARADIES, P., M. SASANELLI, D. DE CAPRARIIS, G. TESTINI, D. TRAVERSA, R.P. LIA, F. DANTAS-TORRES, D. OTRANTO (2010): Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. J.* 186, 370-373.

PARANHOS - SILVA, M., L.A. FREITAS, W.C. SANTOS, G. GRIMALDI YR., L.C. PONTES, DE CARVALHO, A.J. OLIVEIRA DOS SANTOS (1996): A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Hyg.* 31, 39-44.

PENA, M.T., X. ROURA, M.G. DAVIDSON (2000): Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993–1998). *Vet.Ophthalmol.* 3, 35–41.

PENNISI, M.G., S. REALE, S.L. GIUDICE, M. MASUCCI, S. CARACAPPA, M. VITALE, F.VITALE (2005b): Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet. Res. Commun.* 29 (Suppl. 2), 301–303.

PETANIDES, T.A., A.F. KOUTINAS, M.E. MYLONAKIS, M.J. DAY, M.N. SARIDOMICHELAKIS, L.S. LEONTIDES, R. MISCHKE, P. DINIZ, E.B. BREITSCHWERDT, M. KRITSEPI, V.A. GARIPIDOU, C.K. KOUTINAS, S. LEKKAS (2008): Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J. Vet. Intern. Med.* 22, 866–872.

PETERSEN, C.A., S.C. BARR (2009): Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 39 (6), 1065-1074.

PINELLI, E., R. KILLICK – KENDRICK, J. WAGENAAR, W. BERNARDINA, G. DE REAL, J. RUITENBERG (1994): Cellular and humoral immune reponses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect. Immun. 62, 229–235.

PINELLI, E., V.P.M.G. RUTTEN, M. BRUYSTERS, P.F. MOORE, J. RUITENBERG (1999): Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. Infect. Immun. 1, 237-243.

POLI, A., F. ABRAMO, P. BARSOTTI, S. LEVA, M. GRAMICCIA, A. LUDOVISI, F. MANCIANTI (2002): Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. Vet. Parasitol. 106, 181-191.

PORROZZI, R., M.V. SANTOS da COSTA, A. TEVA, A. FALQUETO, A.L. FERREIRA, C.D. dos SANTOS, A.P. FERNANDE, R.T. GAZZINELLI, A. CAMPOS - NETO, G. GRIMALDI Jr. (2007): Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. Clin. Vaccine Immunol. 14, 544–548.

PRATLONG, F., J.A. RIOUX, P. MARTY, F. FARAUT - GAMBARELLI, J. DEREURE, G. LANOTTE, J.P. DEDET (2004): Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features.J. Clin. Microbiol. 42, 4077–4082.

PUCHOL J.L. & J.L. GONZALEZ (1989): Leishmaniosis ocular: afecciones del segmento anterior. In: Proceedings of the XXIV Nat. Cong. of A.V.E.P.A., Barcelona (Spain) pp. 115-122.

PUMAROLA, M., L. BREVIK, J. BADIOLA, A. VARGAS, M. DOMINGO, L. FERRER (1991): J.Comp.Pathol. 105, 279.

PUNDA - POLIĆ, V., S. SARDELIĆ, N. BRADARIĆ (1998): Visceral leishmaniasis in Southern Croatia. Lancet 351, 188.

QUINNELL, R.J., O. COURTENAY, L. GARCEZ & C. DYE (1997): The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. Parasitology 115, 143–156

QUINNELL, R.J., O. COURTENAY, S. DAVIDSON, L. GARCEZ, B. LAMBSON, P. RAMOS, J. J. SHAW, M.A. SHAW, C. DYE (2001): Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular response in a cohort of Brazilian dogs. Parasitology 122, 253–261

RAMOS - E - SILVA, M., C.J. DE MOURA CASTRO (2002): Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. Clin.Dermatol. 20, 122-134.

READY, P.D. (2010): Leishmaniasis emergence in Europe. Euro Surveill, 15:19505.

REALE, S., L. MAXIA, F. VITALE, N.S. GLORIOSO, S. CARACAPPA & G. VESCO (1999): Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. J. Clin. Microbiol. 37, 2931-2935.

REIS, A.B., O.A. MARTINS - FILHO, A. TEIXEIRA - CARVALHO, R.C. GIUNCHETTI, C.M. CARNEIRO, W. MAYRINK, W.L. TAFURI, R. CORREA - OLIVEIRA (2009): Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 128, 87–95.

REISEN, W.K. (2010): Landscape epidemiology of vector-borne diseases. Annu. Rev. Entomol. 55, 461-483.

RHALEM, A., H. SAHIBI, S. LASRI, C.L. JAFFE (1999): Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after drug treatment. Vet. Immunol. Immunopathol. 71, 69-76.

RODRIGUEZ, A., L. SOLANO - GALLEGOS, A. OJEDA, J. QUINTANA, C. RIERA, M. GALLEGOS, M. PORTUS, J. ALBEROLA (2006): Dynamics of *Leishmania*-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. J. Vet. Intern. Med. 20, 495–498.

ROSYPAL, A.C., G.C.TROY, A.M. ZAJAC, G. FRANK, D.S. LINDSAY (2005): Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J. Parasitol.* 91, 970–972.

ROURA, X., A. SANCHEZ & L. FERRER (1999): Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet. Rec.* 144, 262-264.

ROURA, X., A. FONDATI, G. LUBAS, L. GRADONI, M. MAROLI, G. OLIVA, S. PALTRINIERI, A. ZATELLI, E. ZINI (2013): Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Vet. J.* (2013), Article in press
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.001>

SAENZ, R.E., C.G. DE RODRIGUEZ, C.M. JOHNSON, J.D. BERMAN (1991): Efficacy and toxicity of pentostam against Panamanian mucosal leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 394–398.

SALOTRA, P., R. SINGH (2006): Challenges in the diagnosis of post kalaazar dermal leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123, 295–310.

SANTRICH, C., I. SEGURA, A.L. ARIAS, N.G. SARAVIA (1990): Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42, 51–55.

SARAVIA, N.G., A.F. HOLGUIN, D. MCMAHON – PRATT, A.D’ALESSANDRO (1985): Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 714–720.

SCHALLIG, H., L. OSKAM (2002): Diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop. Med. Int. Health* 18, 641-651.

SCHMIDT, G.D., L.S. ROBERTS (1985): Foundations of Parasitology, 3rd edition. Times Mirror/Mosby College Publishing. Pp 34-83.

SCHNUR, L.F., R.L. JACOBSON (1987): Appendix III. Parasitological techniques. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1 (ed. Peters, W. & Killick-Kendrick, R.)

pp. 499-542. Academic Press, New York.

SCHÖNIAN, G., N. ABEDELMAJEED, N. DINSE, C. SCHWEYNOCHE, D. HENK, F.H. SCHALLIG, W. PRESBER, C.L. JAFFE (2003): PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn. Micr. Infec. Dis. 47, 349-358.

SCHRODER, W., G. SCHMIDT (2008): Spatial modelling of the potential temperature dependent transmission of vector-associated diseases in the face of climate change: main results and recommendations from a pilot study in Lower Saxony (Germany). Parasitol. Res. 103, 55-63.

SIDERIS, V., G. PAPADOPOULOU, E. DOTSIKA, E. KARAGOUNI (1999): Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area. Greece Eur. J. Epidemiol. 15, 271-276.

SILVA, F.L., R.G. OLIVEIRA, T.M. SILVA, M.N. XAVIER, E.F. NASCIMENTO, R.L. SANTOS (2009): Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 160, 55-59.

SLAPPENDEL, R.J. (1988): Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. Vet. Q. 10, 1-16.

SLAPPENDEL, R.J., L. FERRER (1998): Leishmaniasis. U: Infectious Diseases of the Dog and Cat 2nd edition. Ch. 73; Ed. C.E. Greene; W.B. Saunders Company. Pp 450- 458.

SOLANO-GALLEGOS, L., J. LLULL, G. RAMOS, C. RIERA, M. ARBOIX, J. ALBEROLA, L. FERRER (2000): The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. Vet. Parasitol. 90, 37-45.

SOLANO-GALLEGOS, L., P. MORELL, P. ARBOIX, J. ALBEROLA, L. FERRER (2001a): Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J. Clin. Microbiol. 39, 560-563.

SOLANO-GALLEGO, L., C.RIERA, X. ROURA, L. INIESTA, M. GALLEGOS, J.E. VALLADARES, R. FISA, S. CASTILLEJO, J. ALBEROLA, L. FERRER, M. ARBOIX, M. PORTUS (2001b): Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.* 96, 265–276.

SOLANO-GALLEGO, L., A. RODRIGUEZ - CORTES, M. TROTTA, C. ZAMPIERON, L. RAZIA, T. FURLANELLO, M. CALDIN, X. ROURA, J. ALBEROLA (2007): Detection of Leishmania infantum DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 147, 315–319.

SOLANO-GALLEGO, L., A. KOUTINAS, G. MIRÓ, L. CARDOSO, M.G. PENNISI, L. FERRER, P. BOURDEAU, G. OLIVA, G. BANETH (2009): Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 165, 1-18.

STRAUSS-AYALI, D., G. BANETH (2001): Canine Visceral Leishmaniasis. In: L. Carmichael (Ed.) Recent Advances in Canine Infectious Diseases. IVIS, Ithaca, NY.

TARTAGLIA, P. (1937): La leishmaniose canine a Split, Bull. Office Intern. Hyg. Publ. XXIV 9

VOLF, P., J. HOSTOMSKA, I. ROHOUSOVA,(2008): Molecular crosstalks in Leishmania-sandfly-host relationships. *Parasite* 15, 237-243.

WANG, J.Y., Y.HA, C.H. GAO, Y. WANG, Y.T. YANG, H.T.CHEN (2011): The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. *Parasit. Vectors* 4:69 <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-3305-4-69.pdf>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2000): Report on global surveillance of epidemic - prone infectious diseases. WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1 Chapter 10: Leishmaniasis and *Leishmania/HIV* co-infection. Pp 121-127.

ZATELLI, A., M. BORGARELLI, R. SANTILLI, U. BONFANTI, E. NIGRISOLI, R. ZANATTA, A. TARLUCCI, A. GUARRACI (2003): Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. Am. J. Vet. Res. 64, 558–561.

ŽIVIČNJAK, T., D. STOJČEVIĆ, A. MARINCULIĆ, T. PETRINOVIC, N. DŽAKULA (1998): Epizootiološka istraživanja viscerale lišmanioze u pasa i izdvajanje protozoona Leishmania infantum // Abstract book from 1st Croatian Congress on infectious diseases with international participation.,106 .

ŽIVIČNJAK, T. (2004): Seroepizootiološka istraživanja lišmanioze na području Splita. (Disertacija). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

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

ŽIVIČNJAK, T., F. MARTINKOVIĆ, R. BECK, A. MARINCULIĆ (2007): Canine Leishmaniosis 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

ŽIVIČNJAK, T., F. MARTINKOVIĆ, D. LUKAČEVIĆ, V. MRLJAK, B. GOLJAK, V. KUTIČIĆ, Z. BAČETIĆ (2008): Serološki monitoring lišmanioze pasa u Hrvatskoj : opcija ili nužnost? // Četvrti hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Zbornik. Harapin, Ivica (ur.). Zagreb : Hrvatska veterinarska komora; Veterinarski fakultet u Zagrebu, 2008. 267-272.

9. PRILOZI

POPIS KORIŠTENIH KRATICA

AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) = Sindrom stečene imunodeficijencije
CanL (Canine leishmaniosis) = Lišmanioza pasa
CD4 (Cluster of differentiation 4) = Podskupina bijelih krvnih stanica
CL (Cutaneous leishmaniosis) = Kožni oblik lišmanioze
Cut-off = Granične vrijednosti rezultata testiranja
CVBD (Canine Vector Borne Diseases) = Bolesti pasa koje se prenose vektorima
DNK = Deoksiribonukleinska kiselina
DNKaza = Deoksiribonukleaza
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) = Etilendiamintetraoctena kiselina
ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) = Imunoenzimni test
FITC = Fluorescin izotiocianat
GIPL = Glikozil-inozitol fosfolipidi
 H_2O_2 = Vodikov peroksid
IFAT (Indirect Fluorescent Antibody test) = Test neizravne imunofluorescencije
IFN- γ = Interferon gamma
IgA = Imunoglobulin A
IgG = Imunoglobulin G
IL-2 = Interleukin 2
IL-10 = Interleukin 10
IL-12 = Interleukin 12
IRIS= International Renal Interest Society
ITS 1 (Internal transcribed spacer 1) = Unutarnja prepisujuća razmaknica 1
IZD = Istočna zemljopisna dužina
MON-1= Oznaka zimodema *L. infantum*
MZOS = Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta
NO = Dušikov monoksid
NZZJZ = Nastavni zavod za javno zdravstvo
OG = Optička gustoća
 O_2 = Kisik

PBS (Phosphate-buffered saline) = Otopina s fosfatnim puferom

PCR (Polymerase chain reaction) = Lančana reakcija polimerazom

pH (Potentia hydrogenii) = Stupanj kiselosti

PKDL (Post kala-azar dermal leishmaniosis) = Post kala-azarna kožna lišmanioza

rA2, rK9, rK26 i rK39 = Lišmanijski antigeni

RNKaza = Ribonukleaza

SAD = Sjedinjene američke države

SZŠ = Sjeverna zemljopisna širina

Th1 (T helper cells 1) = Podskupina bijelih krvnih stanica

Th2 (T helper cells 2) = Podskupina bijelih krvnih stanica

TNF- α = Tumor necrosis factor alpha

WHO (World Health Organization) = Svjetska zdravstvena organizacija

10. ŽIVOTOPIS

Damir Lukačević rođen je 13. prosinca 1966. godine u Sinju. Osnovnu školu završio je u Sinju, a srednju veterinarsku u Splitu. Veterinarski fakultet upisao je akademske godine 1985/86., a diplomirao 1995 godine.

Od 1995. do 2003. godine zaposlen je u Veterinarskoj stanici Sinj na poslovima terenskog i ovlaštenog veterinara. Od 08.04.2003. godine djelatnik je Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb, Podružnica Veterinarski zavod Split na mjestu stručnog suradnika u Laboratoriju za dijagnostiku.

Od 2006. godine obnaša dužnost voditelja Laboratorija za dijagnostiku.

Oženjen je i otac dvoje djece.