

ORIGINALNI RAD / ORIGINAL PAPER

DOI 10.2298/VETGL1604089D

UDC 636.7.09:616.995.132(497.11)"2015"

**MOLEKULARNA DETEKCIJA I ISPITIVANJE ZASTUPLJENOSTI
UZROČNIKA DIROFILARIOZE PASA NA TERITORIJI GRADA BEOGRADA***
*MOLECULAR DETECTION AND INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF
DIROFILARIOSIS CAUSATIVE AGENT IN DOGS ON THE TERRITORY OF BELGRADE*

Davitkov Dajana, Davitkov Darko, Vučićević Miloš, Nešić Vladimir, Glavinić Uroš,
Stevanović Jevrosima, Stanimirović Zoran**

*Dirofilarioza pasa je parazitsko oboljenje izazvano vrstama *Dirofilaria immitis* i *D. repens*. *D. immitis* parazitira u desnoj strani srca i plućnoj arteriji, dovodeći do značajnog funkcionalnog oštećenja srca, dok adultni oblici *D. repens* uglavnom parazitiraju u subkutanom tkivu dovodeći do manjih oštećenja kože. U ovom istraživanju ispitano je 60 pasa, različitih rasa, sa teritorije grada Beograda, u periodu od maja do novembra 2015. godine. Nakon kliničkog pregleda, krv je uzorkovana za detekciju mikrofilarija modifikovanim Knott-ovim testom, kao i za molekularnu detekciju uzročnika. Glavni klinički znaci su bili: brzo zamaranje tokom treninga, otežano disanje i suv kašalj, anoreksija, ubrzan rad srca i promene na koži. Mikrofilarije su detektovane kod 22 psa (37%) modifikovanim Knott-ovim testom. Molekularno genetskom metodom utvrđena je prevalencija *D.immitis* 42%, a *D. repens* 22 %. U sprovedenom istraživanju je bilo 7 pasa koji su bili negativni na Knott testu, dok su metodom PCR pokazali pozitivnu reakciju na prisustvo vrsta iz roda *Dirofilaria*. Na osnovu dobijenih rezultata primena molekularno-genetskih metoda potvrđuje svoju opravdanost u preciznoj i pouzdanoj specijskoj identifikaciji roda *Dirofilaria*.*

*Ključne reči: Beograd, *Dirofilaria* spp, Knott test, pas, PCR*

* Rad primljen za štampu 27.09.2016.

** Dajana Davitkov, dr vet. med., Katedra za biologiju; Darko Davitkov, dr vet.med., asistent, Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači; dr Miloš Vučićević, asistent, Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači; dr Vladimir Nešić, vanredni profesor, Katedra za sudsku veterinarsku medicinu i zakonske propise; Uroš Glavinić, dr vet.med., asistent, Katedra za biologiju; dr Jevrosima Stevanović, vanredni profesor, Katedra za biologiju, dr Zoran Stanimirović, profesor, Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Uvod / Introduction

Nematode roda *Dirofilaria* pripadaju porodici Onchocercidae i subporodici Dirofilarinae, redu Spirurida (Anderson, 2000). Primarni domaćini su psi, a uzročnik može da parazitira i kod vukova, dinga, kojota, lisica, mačaka, feretki, medveda, konja, zečeva, pandi, jelena, majmuna i ljudi (Manfredi i sar., 2007). Psi, posebno lovački, su mnogo češće izloženi komarcima, pa se smatra i da češće oboljevaju (Ebania i sar., 2015). U Evropi najčešće filaride pasa koje se mogu naći u perifernoj krvi su *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) *dracunculoides* i *A. reconditum* (Magnis i sar., 2013). Istraživanja su pokazala da se dirofilarije mogu razvijati u različitim vrstama artropoda, ali na osnovu dosadašnjih ispitivanja jedino se insekti iz reda Diptera, porodice Culicidae ponašaju kao biološki vektori (Cancrini i sar., 2007).

Smatra se da klimatske promene omogućavaju širenje dirofilarioze zbog bržeg razmnožavanja vektora kao što su *Aedes vexans*, *A. albopictus*, *A. cinereus*, *Culex pipiens* i *C. territans* (Cancrini i sar., 2007; Ebania i sar., 2015). Tokom hranjenja vektori penetriraju kožu domaćina i unose u organizam infektivnu formu - larvu stadijuma L3 (Venco i sar., 2011). Larva L3 tokom 3-12 dana od infekcije prelazi u stadijum L4, dok je za prelazak u preadultni oblik potrebno 50-70 dana od infekcije. Adultni oblici *D. immitis* dolaze u desnu stranu srca i pulmonalnu arteriju između 70-85. dana i postaju seksualno zreli nakon 120 dana. Dužina odraslih ženki iznosi 250-310 mm, a širina 1-1.3 mm, dok je dužina odraslih mužjaka 120-200 mm, a širina 0.7-0.9 mm. Prepatentni period iznosi 6-9 meseci, nakon čega ženke kreću da produkuju mikrofilarije. Adulti mogu da žive od nekoliko meseci do nekoliko godina, a mikrofilarije od 2 do 18 meseci (Manfredi i sar., 2007). *Dirofilaria immitis* parazitira u desnoj strani srca i plućnoj arteriji kod pasa, dovodeći do značajnog funkcionalnog oštećenja srca (Albonico i sar., 2014), dok adultni oblici *D. repens* uglavnom parazitiraju u subkutanom tkivu dovodeći do manjih oštećenja kože (Latrofa i sar., 2011).

Kardiovaskularna dirofilarioza pasa ima hroničan, progresivan tok i prvenstveno dovodi do promena na plućima i srcu domaćina (Venco, 2007). Povećanje broja adultnih formi parazita u pulmonalnoj arteriji dovodi do uvećanja endotelnih ćelija *tunica intima* i posledičnog suženja lumena krvnih sudova i smanjenja elastičnosti njihovog zida (Simón i sar., 2012). Usled oštećenja endotela dolazi do aktivacije neutrofilnih granulocita koji se adheriraju na endotel i stvaraju enzime, koji ga dodatno oštećuju. Oštećene površine arterija omogućavaju prolazak albumina, plazme i krvnih ćelija u perivaskularni prostor. Pošto je oboljenje hroničnog toka većina pasa ne pokazuje nikakve kliničke znake duži vremenski period. Simptomi se pojavljuju postepeno i uglavnom se manifestuju kašljem, dispnojom i slabošću. Iako su obe vrste dirofilarija zoonoze smatra se

da je zoonozni potencijal *D. repens* u Evropi znatno veći (Pampiglione i Rivasi, 2000).

Jedini antiparazitik koji deluje na odrasle oblike ove nematode kod pasa je melarsomin dihidrohlorid, međutim tretman sa njim može dovesti do tromboembolije (Menozzi i sar., 2015). Dugotrajna terapija sa ivermektinom ima dobar mikrofilaricidni efekat (Bazzocchi i sar., 2008), ali za potpunu eliminaciju adulta potrebno je oko 36 nedelja (McCall i sar., 2001).

Stevanović i sar. (1971) su prvi put opisali dirofilariozu kod ljudi u Srbiji, a u periodu od 2001.-2008. godine dijagnostikovano je 19 slučajeva dirofilarioze izazvane vrstom *D. repens* (Džamić i sar., 2009). Na osnovu seroloških testova prevalencija ovog oboljenja kod ljudi u Srbiji je veća u severnim delovima zemlje (Pančevo 27,1%, Novi Sad 16,3%) nego u južnim, kao što je Niš sa 5,3% (Tasić-Otašević i sar., 2014). Kada je u pitanju dirofilarioza pasa u Srbiji, u periodu od 2007.-2008. vršeno je ispitivanje na prisustvo mikrofilarija iz uzoraka krvi od 193 psa, kod kojih je *D. repens* bila prisutna sa 49,2 % i *D. immitis* 7,2% (Tasić i sar., 2008). Rađena su serološka testiranja u dve severne regije republike Srbije u cilju potvrđivanja prisustva antigena parazita, koristeći komercijalni kit i antitela kod domaćina, koristeći ELISA testove u cilju detekcije IgG antitela. Seroprevalencija *D. immitis* bila je 22,9 %, a *D. repens* 42,6% (Tasić i sar., 2012).

Brza i tačna dijagnostika dirofilarioze je neophodna da bi se mogla primeniti adekvatna terapija kod ljudi i životinja. Dijagnoza dirofilarioze pasa se najčešće postavlja potvrdom prisustva cirkulišućih antigena, imunohistohemijskom metodom, detekcijom mikrofilarija u krvi inficiranih pasa (Knott-ov test i bojenje na osnovu distribucije kisele fosfataze) i molekularno genetskim ispitivanjima (Genchi i sar., 2007). Prednosti Knott-ovog testa su brzina i efikasnost u pogledu detekcije mikrofilarija. Međutim, nedostaci su mu što zahteva vrlo iskusnog dijagnostičara i nepouzdan je kod mačaka, kod kojih je prisutan izrazito mali broj cirkulišućih mikrofilarija. Danas se sve češće u dijagnostici *D. immitis* koriste molekularno genetske metode, odnosno reakcija lančane polimerizacije (*polymerase chain reaction* - PCR) zbog vrlo visoke specifičnosti, osetljivosti i mogućnosti da se bez greške diferenciraju vrste filarija (Genchi i sar., 2007). Korisnost i primenjivost molekularno genetskih metoda u detekciji uzročnika vektorski prenosivih bolesti potvrđena je i u Srbiji (Özvegy i sar., 2015; Davitkov i sar., 2015; Davitkov i sar., 2016).

Ciljevi ovog rada bili su utvrđivanje prisustva, prevalencije i rasprostranjenosti *D. immitis* i *D. repens* u populaciji pasa na teritoriji grada Beograda, kao i ispitivanje efikasnosti molekularno genetskih metoda u preciznoj specijskoj identifikaciji uzročnika dirofilarioze pasa u odnosu na tradicionalne metode detekcije.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

U periodu od maja do novembra 2015. godine ispitano je 60 pasa na Klinici za male životinje Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Svi psi

su bili sa teritorije grada Beograda i nijedan pas nije napuštao teritoriju Republike Srbije. Svim psima je urađen opšti klinički pregled i uzorkovana krv punkcijom *v. cephalica antebrachii* u vakutajneru sa antikoagulantom (EDTA) za modifikovani Knott-ov test i za PCR.

Modifikovani Knott-ov test je korišćen za detekciju mikrofilarija. Jedan mililitar krvi sa EDTA je pomešan sa 9 ml 2% formalina i centrifugovan 5 minuta na 600 x g. Supernatant je zatim odliven, a 20µl sedimenta je prebačeno na mikroskopsku pločicu i pomešano sa jednakom količinom 1:1000 metilenskog plavog i zatim prekriven pokrovnicom. Pregled je vršen na svetlosnom mikroskopu na uvećanju od 100x i 400x.

DNK je izolovana iz uzoraka krvi sa EDTA koristeći „QIAamp DNA blood Mini kit“ (Qiagen) u skladu sa uputstvom proizvođača. *In vitro* kloniranje fragmenta DNK je obavljeno putem reakcije lančane polimerizacije, odnosno putem PCR amplifikacije u aparatu koji ima mogućnost brze promene temperaturnih uslova (Stevanović i sar., 2011).

Za detekciju *D. immitis* korišćen je set prajmera ROR 91 (5'-GCATCTTAGAAGCTTGGTCCATCC-3') i ROR 92 (5'-CAAAGGCGTATTTACCGCCAC-3') koji ima ulogu da umnožava segment veličine 440 bp 16S rRNK (Watts i sar., 1999). Za detekciju *D. repens* korišćen je set prajmera DIR3 (5'-CCGGTAGACCATGGCATTAT-3') i DIR4 (5'-CCGGTCTTGACGTTTGGTTA-3') koji umnožavaju segment veličine 246 bp (Vaskalis i sar., 1999).

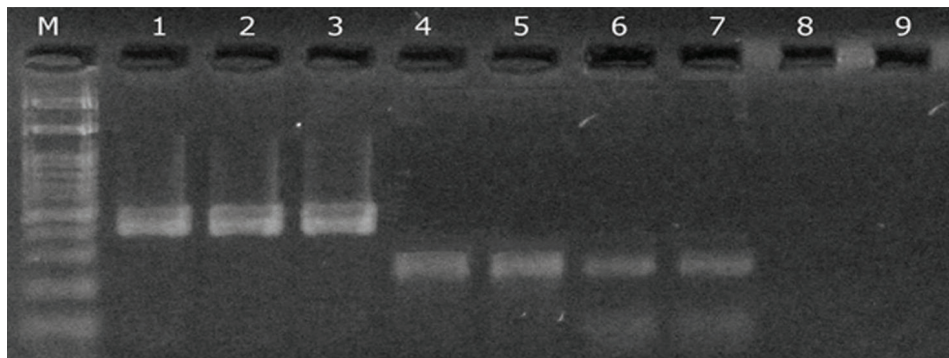
Sve PCR reakcije su izvođene u aparatu Multigene Gradient Thermal Cycler (Labnet International Inc.). PCR reakciona smeša ukupnog volumena 25 µL je sadržala 1xPCR-pufer (Kapa Biosystems), 1,5 mM MgCl₂ (Kapa Biosystems), 100 µM dNTP (Kapa Biosystems), 2 µM svakog prajmera, 0,5 U *Taq* polimeraze (Kapa Biosystems) i 5 µL (10 ng/ µL) izolovane DNK.

Početa denaturacija se odvijala na 95°C tokom 5 minuta, zatim je u 35 ciklusa ponovljena denaturacija 30 sekundi na 95°C, hibridizacija 30 sekundi na 58°C i ekstenzija na 72°C tokom 1 minuta. Finalna DNK ekstenzija se odvijala na 72°C tokom 5 minuta. Isti protokol je korišćen za obe vrste dirofilarija, osim temperature hibridizacije koja je kod *D. repens* iznosila 53°C. Produkti PCR amplifikacije su razdvojeni elektroforezom (pri struji od 50 mA i naponu od 50V u trajanju od 45 minuta) na 2% agaroznom gelu. Za vizuelizaciju DNK u gelu korišćen je etidijum bromid koji fluorescira kad se osvetli UV svetlom.

Rezultati / Results

Ispitano je 60 pasa starosti od jedne do jedanaest godina, različitih rasa, od kojih je najveći broj angažovan u lovu (67%). Dominantni klinički znaci prilikom opšteg pregleda bili su: brzo zamaranje tokom treninga (30%), otežano disanje i suv kašalj (22%), anoreksija (18%), ubrzan rad srca (17%) i promene na koži (8%). Kod svih pasa promene su prisutne duže od dve nedelje, odnosno radilo se o

hroničnom toku bolesti. Najveći procenat pasa sa izraženim kliničkim simptomima bili su psi koji se koriste u lovu (80%).



Slika 1. Prikaz dobijenih rezultata dobijenih na agaroznom gelu obojenom u etidijum bromidu. *Dirofilaria immitis* pozitivni uzorci daju trake veličine 440 bp, a *D. repens* uzorci daju trake veličine 246bp M- Marker (100bp DNA ladder Nippon Genetics, Germany); 1-3 – *Dirofilaria immitis* pozitivni uzorci; 4-7 *Dirofilaria repens* pozitivni uzorci; 8 i 9 – negativna kontrola

Picture 1. Presentation of the results obtained by agarose gel stained with ethidium bromide. *Dirofilaria immitis* positive samples give stripes size 440 bp, and *D. repens* samples give stripes size 246bp M- Marker (100bp DNA ladder Nippon Genetics, Germany); 1-3 – *Dirofilaria immitis* positive samples; 4-7 *Dirofilaria repens* positive samples; 8 i 9 – negative control

Na osnovu rezultata modifikovanog Knott-ovog testa utvrđeno je prisustvo cirkulišućih mikrofilarija kod 22 psa (37%) starosti između dve i osam godina.

Tabela 1. Tabela prikaz rezultata dobijenih metodom modifikovanog Knott testa i PCR
Table 1. Tabular presentation of the results obtained by the method of modified Knott test and PCR

Metoda / Method	Broj pregledanih pasa (N=60) Number of examined dogs (N=60)			
	Modifikovani Knott test / Modified Knott test		PCR	
Uzročnik / Causative agent	Prisutne mikrofilarije / Present microfilariae	Prevalencija / Prevalence	Broj pozitivnih pasa / Number of positive dogs	Prevalencija / Prevalence
<i>Dirofilaria immitis</i>			14	42%
<i>Dirofilaria repens</i>	22	37%	2	22%

Molekularno genetskim metodama u cilju dokazivanja prisustva DNK dirofilarija vrsta, utvrđeno je 14 pozitivnih pasa na *D. immitis* (23%), dva psa pozitivna na *D. repens* (3%), dok je mešovita infekcija ustanovljena kod 11 pasa (18%) (Slika 1). Dobijeni rezultati ukazuju da je prevalencija *D. immitis* 42% (25/60), a *D. repens* 22% (13/60) (Tabela 1). Kod 3 psa koji su bili negativni na Knott testu, dokazana je mešovita infekcija, dok je samo jedan pas bio negativan na

Knott testu, a pozitivan na prisustvo *D. repens* molekularnom metodom detekcije. Nijedan uzorak iz ispitivane grupe pasa nije bio Knott pozitivan, a PCR negativan.

Diskusija / Discussion

Klinički znaci dirofilarioze pasa prikazani u ovom radu ne odstupaju od drugih istraživanja sprovedenih na tlu Evrope, kako u frekvenciji pojave simptoma, tako i u redosledu pojavljivanja. Najčešći simptomi kod pasa koji se navode u literaturi su upavo netolerisanje fizičkog naprezanja, hronični kašalj, tahikardija i tahipnoja, kao i anoreksija (Simon i sar., 2012).

Rezultati dobijeni na osnovu molekularno genetskih ispitivanja su pokazali prevalenciju *D. immitis* 42% i *D. repens* 22% u ispitivanoj grupi životinja. Kod 11 pasa bila je prisutna mešovita infekcija, što se može objasniti učešćem istih vektora u prenošenju različitih vrsta roda *Dirofilaria*. Dobijeni rezultati nisu u korelaciji sa rezultatima dobijenim na osnovu seroloških metoda na teritoriji Pančeva i Velikog Gradišta, gde je prevalencija *D. repens* iznosila 42.6%, a *D. immitis* 12.3% (Tasić i sar., 2012).

Veća prevalencija *D. immitis* u našem istraživanju u odnosu na ranija istraživanja na teritoriji Srbije mogu se objasniti klimatskim promenama koje omogućavaju razvoj i širenje vektora, kao i prisustvom pasa obolelih od dirofilarioze, koji još uvek nisu dijagnostikovani i lečeni, pa su nosioci mikrofilarija i imaju veliki uticaj na širenje uzročnika dirofilarioze (Albonico i sar., 2014).

U našem istraživanju je bilo 7 pasa koji su bili negativni na Knott testu, dok su metodom PCR pokazali pozitivnu reakciju na prisustvo *Dirofilaria* vrsta. Postojanje mogućnosti dobijanja lažno negativnih rezultata je upravo jedan od glavnih problema upotrebe seroloških metoda detekcije i Knott testa, što je zapaženo i u prethodnim istraživanjima (Rishniw i sar., 2006). Zbog toga su se u proteklih nekoliko godina razvile različite molekularne metode za diferencijaciju vrsta roda *Dirofilaria* koje omogućavaju tačnu i preciznu dijagnostiku ove nematodoze (Gioia i sar., 2010; Latrofa i sar., 2011).

Iako u našem radu nije bilo uzoraka koji su bili pozitivni na Knott testu, a negativni metodom PCR, na ovakve uzorke treba posebno obratiti pažnju zbog mogućeg prisustva drugih vrsta filarija. Osim *D. immitis* postoji još barem šest filarida koje produkuju mikrofilarije, a daju negativne rezultate seroloških testova na prisustvo antigena *D. immitis* (Rishniw i sar., 2006). To je jedan od razloga zbog čega su tradicionalne metode problematičnije u svim situacijama kada je dosta teško napraviti morfološku razliku između mikrofilarija različitih vrsta ili u slučaju mešovite infekcije (Rishniw i sar., 2006; Genchi i sar., 2007). Tačna identifikacija filarija vrsta kod pasa može biti od velikog značaja, kako zbog zoonoznog potencijala tako i zbog terapije obolelih životinja. *A. canthocheilonema reconditum* i *A. dracunculoides* nemaju veći klinički značaj, dok *D. repens* uglavnom dovodi do stvaranja subkutanih granuloma i pruritusa kod pasa (Baneth i sar., 2002;

Tarello, 2003), kao i stvaranja konjunktivalnih i pulmonalnih nodula (Cordonnier i sar., 2002).

Visok procenat obolelih lovačkih pasa u našem radu je u pozitivnoj korelaciji sa radovima drugih autora i smatra se da je ustanovljena prevalencija velika upravo zbog njihove izloženosti vektorima i čestih odlazaka u epizootiološka područja u kojima je prevalencija dirofilarioze visoka (Lim i sar., 2010; Vieira i sar., 2014).

Zaključak / Conclusion

Rezultati istraživanja potvrđuju opravdanost upotrebe molekularnih metoda detekcije u preciznoj specijskoj identifikaciji uzročnika dirofilarioze pasa. Precizna detekcija uzročnika je neophodna u obezbeđivanju osnovnih informacija o prevalenciji, incidenciji i rasprostranjenosti u populaciji pasa na određenom području, kao i za sprovođenje adekvatnih i efikasnih mera zdravstvene zaštite ljudi i životinja. Dalja istraživanja će biti usmerena na ispitivanje potencijalnih vektora uključenih u prenos *D. immitis* i *D. repens*, kao i razvijanja metode *real time* PCR zbog preciznije kako kvalitativne, tako i kvantitativne detekcije uzročnika. Mogućnost precizne dijagnostike inficiranih pasa je od ključnog značaja u prevenciji širenja dirofilarioze pasa.

Literatura / References

1. Albonico F, Loiacono M, Gioia G, Genchi C, Genchi M, Mortarino M. Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolution melting analysis. *Vet Parasitol* 2014; 200(1-2): 128-32.
2. Anderson RC. Nematode parasites of vertebrates, their development and transmission. 2nd Edition, CABI Publishing, Wallingford, UK, 2000.
3. Baneth G, Volansky Z, Anug Y, Favia G, Bain O, Goldstein RE, Harrus S. *Dirofilaria repens* infection in a dog: diagnosis and treatment with melarsomine and doramectin. *Vet Parasitol* 2002; 105: 173-8.
4. Bazzocchi C, Mortarino M, Grandi G, Kramer LH, Genchi C, Bandi C, Genchi M, Sacchi L, McCall JW. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Int J Parasitol* 2008; 38: 1401-10.
5. Cancrini G, Gabrielli S. Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships. *Mappe Parassitologiche* 2007; 8: 47-59.
6. Cordonnier C, Chatelain D, Nevez G, Sevestre H, Gontier MF, Raccurt CP. Difficulties in diagnosis of human dirofilariasis outside known enzootic areas. *Rev Med Interne* 2002; 23: 71-6.
7. Davitkov D, Vučićević M, Stevanović J, Krstić V, Tomanović S, Glavinić U, Stanimirović Z. Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia. *Acta Vet Hung* 2015; 63(2): 199-208.
8. Džamić AM, Colovic IV, Arsic-Arsenijevic VS, Stepanovic S, Boricic I, Džamic Z, Mitrovic SM, Rasic DM, Stefanović I, Latković Z. Human *Dirofilaria repens* infections in Serbia. *J Helminthol* 2009; 14: 129-37.
9. Ebania VV, Nardonia S, Fognania G, Mugnainia L, Bertellonia F, Rocchigiana G, Papinia RA, Stefanib F, Manciantia F. Molecular detection of vector-borne bacteria and protozoa in healthy hunting dogs from Central Italy. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015; 5 (2): 108-12.

10. Genchi C, Venco L, Genchi M. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. *Mappe Parasitologiche* 2007; 8: 137-45.
11. Gioia G, Lecová L, Genchi M, Ferri E, Genchi C, Mortarino M. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Vet Parasitol* 2010; 27: 172 (1-2): 160-3.
12. Latrofa MS, Dantas-Torres F, Annoscia G, Genchi M, Traversac D, Otranto D. A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. *Vet Parasitol* 2011; 185 (2-4): 181-5.
13. Lim S, Irwin PJ, Lee SR, Hwan OM, Ahn KS, Myung BY, Shin SS. Comparison of selected canine vector-borne diseases between urban animal shelter and rural hunting dogs in Korea. *Parasit Vectors* 2010; 3:32.
14. Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasit Vectors* 2013; 6 (48): 1-5.
15. Manfredi MT, Di Cerbo A, Genchi M. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. *Mappe Parasitologiche* 2007; 8: 39-47.
16. McCall JW, Guerrero J, Roberts RE, Supakorndej N, Mansour AE, Dzimianski MT, McCall SD. Further evidence of clinical prophylactic, retro-active (reach-back) and adulticidal activity of monthly administrations of ivermectin (Heartgard Plus™) in dogs experimentally infected with heartworms. In: Seward, R.L. (Ed.), *Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium 001*. American Heartworm Society, Batavia 2001; 189-200.
17. Menozzia A, Bertini S, Turinb L, Serventia P, Kramera L, Bazzocchib C. Doxycycline levels and anti-Wolbachia antibodies in sera from dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* and treated with a combination of ivermectin/doxycycline. *Vet Parasitol* 2015; 209: 281-4.
18. Özvegy J, Marinković D, Vučićević M, Gajić B, Stevanović J, Krnjaić D, Aleksić-Kovačević S. Cytological and molecular identification of *Haemogregarina stepanowi* in blood samples of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) from quarantine at Belgrade Zoo. *Acta Vet Beograd* 2015; 65(4): 443-53.
19. Pampiglione S, Rivasi F. Human dirofilariasis due to *Dirofilaria* (*Noctiella*) *repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. *Parassitologia* 2000; 42 (3-4): 231-54.
20. Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Frongillo MF, Franz M, Dominguez JLA. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 2006; 135: 303-14.
21. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA. Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25 (3): 507-44.
22. Stevanović R., Savić-Cvetojević M., Petrović Z. Dirofilariasis in a 10-year-old boy: A case report. *Acta Parasitologica Iugoslavica* 1971; 2: 93-97 (in Serbian).
23. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic RS, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 2011; 42: 49-58.
24. Tarello W. Dermatitis associated with *Dirofilaria repens* microfilariae in three dogs in Saudi Arabia. *J Small Anim. Pract* 2003; 44: 132-4.
25. Tasić A, Rossi L, Tasić S, Miladinović-Tasić N, Ilić T, Dimitrijević S. Survey of canine dirofilariasis in Vojvodina, Serbia. *Parasitol Res* 2008; 103 (6): 1297-302.
26. Tasić A, Tasić-Otašević S, Gabrielli S, Miladinović-Tasić N, Ignjatović A, Đorđević J, Dimitrijević S, Cancrini G. Canine *Dirofilaria* Infections in Two Uninvestigated Areas of Serbia: Epidemiological and Genetic Aspects. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12 (12): 1031-5.
27. Tasić-Otašević SA, Gabrielli SV, Tasić AV, Miladinović-Tasić NL, Kostić JT, Ignjatović AM, Popović Dragonjić LD, Milošević ZG, Arsić-Arsenijević VS, Cancrini GA. Seroreactivity to

- Dirofilaria antigens in people from different areas of Serbia. BMC Infect Dis 2014; 14 (68): 1-6.
28. Vakalis N, Spanakos G, Patsoula E, Vamvakopoulos NC. Improved detection of *Dirofilaria repens* DNA by direct polymerase chain reaction. Parasitol Int 1999; 48: 145-50.
29. Venco L, Genchi C, Simón F. "La filariosis cardiopulmonar (*Dirofilaria immitis*) en el perro". 19-60. In Simón F, Genchi C, Venco L, Montoya MN (ed), La filariosis en las especies domésticas y en el hombre 2011; Meril Laboratorios, Spain.
30. Venco L. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs. Mappes Parasitologiche 2007; 8: 117-27.
31. Vieira AL, Vieira MJ, Oliveira JM, Simões AR, Diez-Baños P, Gestal J. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. Parasite 2014; 21: 5.
32. Watts KJ, Courtney CH, Reddy GR. Development of a PCR- and probe-based test for the sensitive and specific detection of the Dog Heartworm, *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host. MCP 1999; 14: 425-30.

ENGLISH

MOLECULAR DETECTION AND INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF DIROFILARIOSIS CAUSATIVE AGENT IN DOGS ON THE TERRITORY OF BELGRADE

Davitkov Dajana, Davitkov Darko, Vučićević Miloš, Nešić Vladimir, Glavinić Uroš, Stevanović Jevrosima, Stanimirović Zoran

Dirofilariosis in dogs is a parasitic disease caused by the strains *Dirofilaria immitis* and *D. Repens*. *Dirofilaria immitis* parasitizes in the right side of the heart and pulmonary artery, causing considerable functional impairment of the heart, while adult forms of *D. repens* mostly parasitize in subcutaneous tissue causing minor skin damage. In this investigation, during the period from May to November 2015, 60 dogs of different race from the territory of Belgrade were examined.

After the clinical examination, the blood was sampled for microfilariae detection by Knott test, as well as for molecular detection of the agent. Main clinical signs were: fatigue during exercise, shortness of breath and dry cough, anorexia, rapid heartbeat and skin changes. Microfilariae were detected in 22 dogs (37%) by modified Knott test. By molecular genetic method there was determined the prevalence of *D. immitis* 42%, and *D. repens* 22%. In this investigation 7 dogs were negative on Knott test, but by PCR method they showed a positive reaction on the presence of species of the genus *Dirofilaria*. On the basis of the obtained results, the application of molecular-genetic methods is justified in accurate and reliable species identification of *Dirofilaria* genus.

Key words: Belgrade, *Dirofilaria* spp, Knott test, dog, PCR

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДИРОФИЛЯРИОЗА У СОБАК НА ТЕРРИТОРИИ ГОРОДА БЕЛГРАДА

Давитков Дайана, Давитков Дарко, Вучичевич Милош, Нешич Владимир, Главинич Урош, Стеванович Евросима, Станимирович Зоран

Дирофиляриоз у собак - паразитное заболевание, вызываемое видами *Dirofilaria immitis* и *D. repens*. *Dirofilaria immitis* паразитирует в левой части сердца и легочной артерии, что приводит к значительному функциональному повреждению сердца, в то время как взрослые формы *D. repens* в основном паразитируют в подкожной клетчатке, приводя к небольшим повреждениям кожи. В этом исследовании принимали участие 60 собак различных пород с территории города Белграда за период с мая по ноябрь 2015 года. После клинического осмотра взяты образцы крови для определения микрофилярий модифицированным тестом Нотта, а также для молекулярного определения возбудителей. Основными клиническими признаками были: быстрая утомляемость во время тренировки, тяжелое дыхание и сухой кашель, анорексия, ускоренное сердцебиение и изменения на коже. Микрофилярии обнаружены у 22 собак (37%) с помощью модифицированного теста Нотта. Молекулярно-генетическим методом подтверждено преобладание *D. immitis* 42%, а *D. repens* 22%. В проведенном исследовании участвовали 7 собак, результаты теста Нотта для которых были отрицательны, в то время как с помощью метода PCR выявлена положительная реакция на наличие видов из рода *Dirofilaria*. На основании полученных данных применение молекулярно-генетического метода подтверждает свою оправданность в точной и надежной специфической идентификации рода *Dirofilaria*.

Ключевые слова: Белград, *Dirofilaria* spp, тест Нотта, собака, PCR