

**SEROPREVALENCIJA PASA NA ANTIGENE LEISHMANIA INFANTUM  
NA TERITORIJI CRNE GORE\***  
**SEROPREVALENCE OF DOGS TO LEISHMANIA INFANTUM ANTIGENS IN  
THE TERRITORY OF CRNA GORA**

Pavićević Zorica, Laušević D, Pejović N\*\*

Zbog širenja vektorskih bolesti i njihovog značaja za zdravlje ljudi utvrđivali smo prevalenciju antitela na antigene *Leishmania infantum* u serumskim uzorcima pasa. Lajšmanioza je protozoonoza uzrokovana vrstama iz roda *Leishmania*. Po podacima Svetske zdravstvene organizacije bolest je stalna pretnja za 350 miliona ljudi u 88 zemalja sveta, a većina zemalja Mediterana pripada području označenom kao endemsko. S obzirom na to što je i Crna Gora zemlja mediteranskog basena, značajno je predstaviti rezultate ispitivanja prisustva antitela na antigene *L. infantum* u krvnom serumu pasa, imajući u vidu ulogu pasa kao rezervoara i izvora infekcije za ljude.

U periodu od 2006. do 2010. godine pregledano je 433 uzorka seruma pasa sa kliničkim simptomima i 68 uzoraka seruma pasa bez simptoma bolesti. Reč je o psima sa vidljivim simptomima bolesti od kojih su najprisutniji: alopecija, gubitak telesne mase i limfadenomegalija. U 66% slučajeva poznat je i hematološki profil u kom dominira hipohromna anemija i neutrofilna leukocitoza. Ispitivanjem je obuhvaćeno i 68 asimptomatskih pasa u dobroj kondiciji, od kojih su 45 službeni psi u upotrebi u vojsci i policiji i 23 psa iz azila.

Metodom indirektno imunofluorescencije (IFAT) i direktnim aglutinacionim testom (DAT) određivano je prisustvo specifičnih antitela na antigene *L. infantum*. Pozitivan nalaz u serumskom razređenju 1:160 utvrđen je u 258 uzoraka (59,58%) u grupi pasa sa kliničkim simptomima i u 5,9% kod ispitivanih asimptomatskih pasa. Deo teritorije Crne Gore sa srednjom godišnjom temperaturom vazduha od 14,6-17,8°C i mediteranskom klimom sa dugim, toplim i suvim letima i blagim i kišovitim zimama, ima važan klimatski preduslov za održavanje i razvoj ove parazitske infekcije. Potvrđeno prisustvo pet vrsta *Phlebotomina*

\* Rad primljen za štampu 02. 07. 2013. godine

\*\* Dr sc. Zorica Pavićević, mr sc. Dejan Laušević, mr sc. Nikola Pejović, Specijalistička veterinarska laboratorija, Podgorica

*na teritoriji Crne Gore koji su neophodni u ciklusu razvoja i održanja Leishmania vrsta sa dominantnom vrstom Phlebotomus neglectus, dodatno opravdava veliki rizik postojanja i održanja bolesti. Dobijeni rezultati ispitivanja seroprevalence kod pasa u korelaciji su i sa rezultatima Instituta za javno zdravlje o registrovanih 55 slučajeva visceralne lajšmanioze kod ljudi u periodu od 1992-2009 godine. Ne zanemarujući saznanje da seronegativan nalaz i nepostojanje simptoma bolesti ne isključuje infekciju, kao i da seropozitivan nalaz ne znači samo postojanje infekcije, visok nivo seroprevalence (59,58%) kod pasa u urbanim regijama Crne Gore potvrđen u nizu od 5 godina, alarmantan je epizootiološki i epidemiološki podatak.*

*Ključne reči: Leishmania, pas, seroprevalenca, Crna Gora*

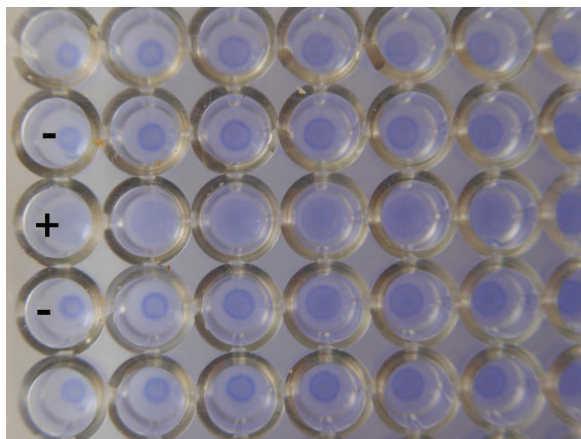
#### Uvod / Introduction

Lajšmanioza je vektorska parazitska zoonoza registrovana na svim kontinentima izuzev Antarktika. Uzrokovana je flagelarnom protozoonom iz roda *Leishmania* od kojih je preko 20 vrsta patogeno za sisare. Najprisutnija vrsta uzročnika u regiji Mediterana je *Leishmania infantum*, prepoznata kao uzročnik visceralne i kožne forme bolesti kod pasa i visceralne forme kod ljudi. Širenje i transmisija bolesti je primarno vektorska preko malih insekata Papatača, u kojima se odvija faza razvoja parazita do infektivne forme Promastigota. Endemski se bolest pojavljuje u 88 zemalja gde je riziku od bolesti izloženo 350 miliona ljudi, a Svetska zdravstvena organizacija registruje godišnje dva miliona novih slučajeva kod ljudi od kojih oko 60 hiljada završi smrću (WHO, 2009; Desjeux, 2001). Region Mediterana je endemska zona (Galego i sar., 2001) sa velikim rizikom za širenje bolesti zbog postojećih i najavljivanih klimatskih promena (Mitrović i sar., 2009) kao i zbog povećane frekvence putovanja ljudi i pasa i povećanja broja ljudi sa statusom imunodeficijencije. Iako je bolest potvrđena kod mačaka, konja, glodara – psi su glavni rezervoar i izvor rizika bolesti za ljude. Rezultat ispitivanja prisustva antitela na antigene *Leishmania infantum* kod pasa na teritoriji Crne Gore, koja je geografski i klimatološki izložena riziku, važan je epizootiološki i epidemiološki podatak.

#### Materijal i metode rada / Material and methods

U periodu od 2006. do 2010. godine pregledano je 433 uzorka seruma pasa sa ili bez tipičnih simptoma bolesti i 68 uzoraka seruma asimptomatskih pasa, različite starosti i rasa. Najprisutniji simptomi su alopecija, gubitak telesne mase i limfadenomegalija, a u 66% slučajeva poznat je i hematološki profil gde dominira hipohromna anemija i neutrofilna leukocitoza. Ispitivanjem je obuhvaćeno i 68 asimptomatskih pasa u dobroj kondiciji, 45 službenih pasa u upotrebi u vojsci i policiji i 23 psa iz azila. U dijagnostici lajšmanioze rasprostranjena je primena se-

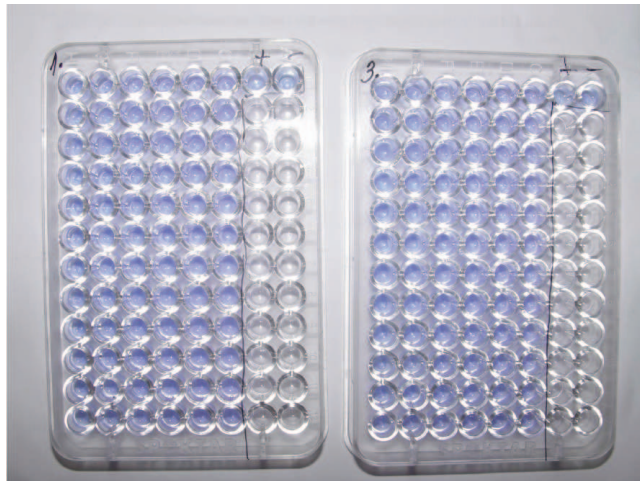
roloških testova, uključujući test imunofluorescencije (IFA), direktni aglutinacioni test (DAT), imuno-enzimski test (ELISA), indirektna hemaglutinacija (IHA). Kao najčešće korišćeni i preporučeni serološki metod je test indirektna imunofluorescencije sa karakteristikama osetljivosti od 100% i specifičnosti od 90% (Ferroglia i sar., 2006) u zavisnosti od specifičnosti korišćenog antigena i uspostavljene granične vrednosti. Nakon izdvajanja i centrifugiranja, sakupljene serumske uzorke, ispitivali smo testom indirektna imunofluorescencije za detekciju antitela protiv antigena *L.infantum* (Leishmania IFA Canine IgG Antibody Kit, Fuller laboratories, USA). Posle razređenja seruma fosfatnim puferom, u nizu od 1: 40 do 1:160, nanosili smo na slajd pločice sa fiksiranim promastigotama po 10  $\mu$ l serumskog uzorka. Nakon propisane inkubacije i ispiranja dodavan je konjugat sa fluorescein vezanim antitelima (Anti-canine IgG conjugate) koji omogućava vizualizaciju reakcije antigen–antitelo. Pomoću fluorescentnog mikroskopa lako uočljive zeleno prebojene promastigote označavale su pozitivnu reakciju i istovremeno, zbog potvrde i provere procenjen rezultat je upoređivan sa pozitivnim i negativnim kontrolnim uzorcima koji su nerazređeni nanošeni na slajd pločice. Direktnim aglutinacionim testom (KIT Biomedical Research, Netherlands) posle inaktivacije seruma na 56°C ispitivali smo prisustvo antitela na promastigote 1S faze *L. infantum*, u koncentraciji  $5 \times 10^7$  /ml, korišćenim kao antigen. Zbog velike reproduciбилности i mogućnosti razređenja seruma u velikom nizu, kao i zbog jednostavne primene, metoda DAT je veoma prihvatljiva. Posle aktivacije antigena (Freeze-dried antigen) fiziološkim rastvorom, antigen je nanošen u udubljena mikro-titar ploče u količini od 50  $\mu$ l. Zatim je dodavan razređen serum u titarskom nizu od 1:50 do 1:51200. Dugačak niz serumskog razređenja ukrštene i nespecifične reakcije svodi na minimum, a lako uočljiva razlika pozitivnog i negativnog nalaza preporučuje test (Silva, 2005) kao izborni za trijažu većeg broja uzoraka (slika 1).



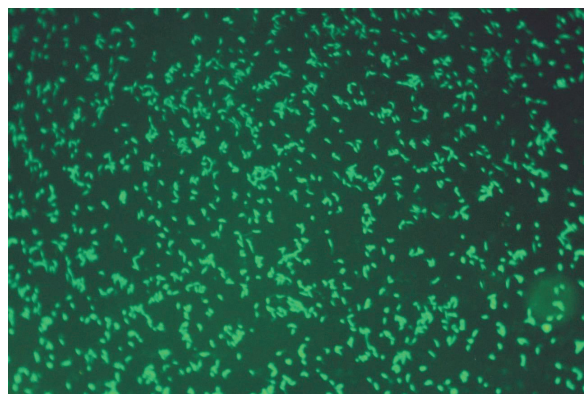
Slika 1. Direktni aglutinacioni test - pozitivan i negativan uzorak  
Figure 1. Direct agglutination test - positive and negative samples

## Rezultati / Results

Pozitivan nalaz u serumskom razređenju 1:160 utvrđen je u 258 uzoraka (59,58%) od ukupno 433 ispitana uzorka u grupi pasa sa kliničkim simptomima i u 5,9% kod ispitivanih asimptomatskih pasa. Iako je granična preporučena vrednost za test indirektno imunofluorescencije 1:40, zbog pouzdanosti rezultata i eliminisanja nespecifičnih reakcija kao pozitivan titar je smatran 1:160. Preporučene granične vrednosti za DAT ne postoje, već u zavisnosti od ranije dobijenih rezultata ustanoviti lokalno-endemsku graničnu vrednost. Kao pozitivan rezultat za DAT smatrano je razređenje 1:320. Testom direktne aglutinacije uočen je pozitivan rezultat u serumskom titru 1: 6400 u 75% testiranih uzoraka (slika 2). Pomoću flu-

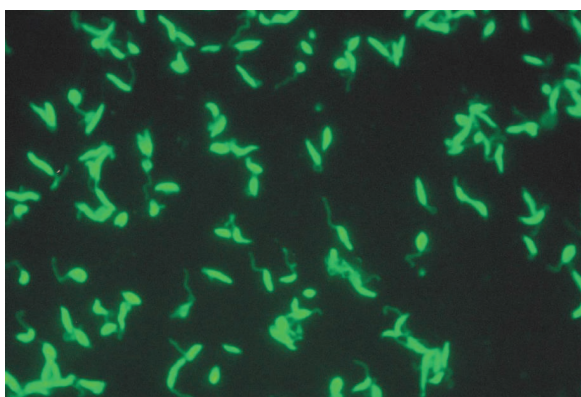


Slika 2. Direktni aglutinacioni test - pozitivni uzorci  
Figure 2. Direct agglutination test - positive samples



Slika 3. Test indirektno imunofluorescencije, uvećanje 1:40  
Figure 3. Indirect immunofluorescence test - enlargement 1:40

orescentnog mikroskopa, uvećanjem 1:40 i 1:100, uočavaju se jasno zelene promastigote sa fluorescentnim sjajem koji ih čini lako vidljivima. Ovakav nalaz svodi subjektivnost u proceni rezultata za IFA test kod ovog oboljenja na zanemarljivu meru (slike 3, 4).



Slika 4. Test indirektne imunofluorescencije, uvećanje 1:100  
Figure 4. Indirect immunofluorescence test- enlargement 1:100

#### Diskusija / Discussion

Imajući u vidu potencijalne rizike za održanje i širenje lajšmanioze, zabrinutost za regiju Crne Gore je opravdana. Deo krajnjeg jugoistoka Crne Gore, sa područjem opštine Podgorica, oblasti oko Skadarskog jezera i teritorije opština Bar i Ulcinj, sa srednjom godišnjom temperaturom vazduha od 14,6 do 17,8°C i mediteranskom klimom sa dugim, toplim i suvim letima i blagim i kišovitim zimama i srednjom godišnjom količinom padavina od 900 do 1300 l/m<sup>2</sup> imaju važan klimatski preduslov za održanje ove parazitske infekcije. Rodu *Phlebotomus* i *Lutzomyia* pripada preko 700 vrsta Papatača prepoznati kao vektori, od kojih je 30 antropofagno. Na teritoriji Crne Gore potvrđeno je prisustvo pet vrsta: *Phlebotomina*, *P. Papatasi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. perfuliewi* i *Sergentomyia minuta* (Ivović, 2003), koje su neophodne u ciklusu razvoja i održanja Leishmania vrsta, sa dominantnom vrstom *Phlebotomus neglectus* (Ivović, 2004). Ovaj nalaz dodatno opravdava veliki rizik postojanja za pojam bolesti za navedenu teritoriju. Dobijeni rezultati ispitivanja seroprevalence kod pasa u korelaciji su i sa rezultatima Instituta za javno zdravlje o registrovanih 55 slučajeva visceralne lajšmanioze kod ljudi u periodu od 1992-2009 (Beatović, 2010). Geografska distribucija broja obolelih ljudi po opštinama u Crnoj Gori potvrđuje najveći broj slučajeva (39) sa teritorija Bara, Ulcinja i Podgorice što je u saglasnosti sa brojem sero-pozitivnih pasa na antigene *L. infantum*. Od ukupnog broja pozitivnih serumskih uzoraka pasa 72% je sa teritorije ovih jugoistočnih opština.

Pojava bolesti u regijama izvan tropskog i subtropskog pojasa objašnjava se promjenom biologijom vektorskih insekata i mogućnošću preživljavanja larvi u stanju dijapauze tokom više meseci (Ready PD, 2010). Visoka prevalenca asimptomatskih nosioca infekcije (Martín-Sánchez J, 2004) sugeriraju da je bolest velika latentna opasnost za ljude. Rezultati naših ispitivanja podržani su podatkom da je u endemskoj regiji Mediteranskog bazena seroprevalenca pasa 67% i mnogo je viša nego prevalenca bolesti, ukazujući na veliki značaj genetike domaćina i razvoja humoralne ili celularne odbrane na ishod bolesti (Sanchez i sar., 2005). Italija, u zavisnosti od oblasti beleži prevalencu kod pasa od 1,7 do 48,4%, a Francuska od 2,5 do 23% (Moreno i Alvar, 2002). Uz saznanje da 75-95% nelečenih slučajeva kod dece i imunokompromitujućih ljudi završava smrću (Center for Food Security & Public health, 2009), rezultati naših ispitivanja osnova su za sveobuhvatnija ispitivanja bazirana na većem broju uzoraka. S obzirom na utvrđenu seroprevalencu kod uličnih i asimptomatskih pasa ima osnova za pokretanje inicijative za izradu programa za kontrolu i suzbijanje bolesti. Utvrđeno prisustvo nekih vrsta *Leishmania* kod nekoliko vrsta divljih životinja (šumski glodari, lisica, šakal, vuk) (Torres, 2007) i kod još nekih domaćih (mačka, konj) (Center for Food Security & Public health, 2009), razlog je još veće zabrinutosti zbog postojanja i sekundarnih izvora bolesti. Ispitivanja usmerena ka razvoju efikasnijih vakcina za pse, kontrolisana upotreba repelenata i insekticida značajnih za transmisiju bolesti, samo su deo programa koje pojedine zemlje preduzimaju, shvatajući zdravstveni i ekonomski značaj preventivnog delovanja (Italija, Indija, Brazil) (Sharma i Singh, 2008). Visok nivo seroprevalence (59,58%), potvrđen u nizu od 5 godina, kod pasa u urbanim regijama Crne Gore alarmantan je epizootiološki i epidemiološki podatak.

#### Literatura / References

1. Beatović V. Leishmaniosis in the Balkan countries. Inter-country Meeting in the WHO European Region. Dubrovnik, Croatia 2010.
2. Center for Food Security and Public Health, Department for Parasitology. Leishmaniasis (Cutaneous and Visceral). Iowa State University 2009. [www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf), Last Updated oct. 2009.
3. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95(3): 239-43.
4. Ferroglio E, Centaro N, Mignone W, Triscinoglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Veterinary Parasitology* 2006; 09:017.
5. Galego LS, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. 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* 2001; 39(2): 560-3.
6. Ivović V, Ivović M, Mišćević Z. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Bar area of Montenegro (Yugoslavia). *Ann Tropical Med Parasitol* 2003; 97(2): 193-7.
7. Ivović V. ScD, Doctor of Science degree (equivalent to PhD), School of Biology-University of Belgrade Thesis title: Geographic distribution, bionomy and vectorial status of *Phlebotomus neglectus* (Diptera: Psychodidae), the most important vector of zoonotic leishmaniasis

- in the Eastern Mediterranean. 2004; ScD, Doctor of Science degree (equivalent to PhD), School of Biology-University of
8. Martín-Sánchez J, Pineda JA, Morillas-Márquez F, García-García JA, Acedo C, Macías J. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70(5): 545-8.
  9. Mitrović L, Pejanović G, Pavićević D. Promjena sezonskih temperatura i akumuliranih padavina na slivu rijeke Morače po A1B scenariju promjene klime. 2009; Zavod za hidrometeorologiju i seizmologiju Crne Gore. <http://www.meteo.co.me/publikacije/HE%20Moraca-meteo-FINAL.pdf>
  10. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002; 18: 399-405.
  11. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance* 2010; 15: 10.
  12. Sanchez-Robert E, Atlet L, Sanchez A, Francino O. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) Gene and Canine Leishmaniasis in a Case-Control Study. *J Hered* 2005; 96(7): 755-8.
  13. Sharma Umakant, Singh Sarman. Insect Vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 2008; 45: 255-72.
  14. Silva SE *et al.* Application of Direct Agglutination Test (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2005; 4: 4.
  15. Torres-Dantas F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania infantum)* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149: 134-46.
  16. World Health Organization. Control of the Leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Tech Rep Ser, 2009.

ENGLISH

## SEROPREVALENCE OF DOGS TO LEISHMANIA INFANTUM ANTIGENS IN THE TERRITORY OF CRNA GORA

Pavićević Zorica, Laušević D, Pejović N

Due to expansion of vector borne diseases and their importance for human health, we have investigated the prevalence of antibodies to *Leishmania infantum* antigens in serum samples of dogs. Leishmaniasis is a disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. According to the World Health Organization the disease is a constant threat to 350 million people in 88 countries, provided that most Mediterranean countries belong to the area designated as endemic. Since Crna Gora is a country of Mediterranean basin, it is important to present the results of the investigation on the presence of antibodies on *L. infantum* antigens in blood serum of dogs, considering that dogs can be reservoirs and source of infection for humans.

In the period from 2006. to 2010., there were tested 433 serum samples of dogs with clinical symptoms and 68 serum samples of dogs without symptoms of the disease. Those were dogs with visible symptoms of the disease such as alopecia, weight loss and lymphadenomegalia. In 66% of cases, there was known hematological profile with predominant hypochromic anemia and neutrophilic leukocytosis. As mentioned above, the investigation included also 68 asymptomatic dogs in good condition, out of which 45 were service dogs

in use in military and police as well as 23 dogs from the asylum.

By Indirect immunofluorescence test or Indirect Fluorescent Antibody Technique (IF-AT) and Direct Agglutination Test (DAT), there was determined the presence of specific antibodies to *L.infantum* antigens. Positive findings in the serum dilution 1:160 was determined in 258 samples (59.58%) in the group of dogs with clinical symptoms, and in 5.9% in the tested asymptomatic dogs. A part of the territory of Crna Gora with its average annual air temperature of 14.6 – 17.8°C and mediterranean climate (long, warm and dry summer and mild, rainy winter) has all the prerequisites for the development and maintenance of the infection. The confirmed presence of five kinds of Phlebotomines on the territory of Crna Gora which are essential in the cycle of developing and maintaining of *Leishmania* species with dominant *Phlebotomus neglectus* species, additionally proves a great risk of occurrence and maintenance of the disease. The obtained results of seroprevalence in dogs are in correlation with the results of 55 cases of visceral leishmaniasis recorded by the Institute for Public Health in people from 1992 to 2009. Taking into consideration that seronegative findings and absence of symptoms does not exclude the infection, as well as that seropositive finding does not necessarily confirm it, a high level of seroprevalence (of 59.58%) in dogs in urban regions of Crna Gora, recorded during 5 years period, is by itself an alarming epizootiological and epidemiological fact.

Key words: *Leishmania*, dog, seroprevalence, Crna Gora

РУССКИЙ

## СЕРОПРЕВАЛЕНТНОСТЬ К АНТИТЕЛАМ *LEISHMANIA INFANTUM* У СОБАК НА ТЕРРИТОРИИ ЧЕРНОГОРИИ

Павичевич Зорица, Лаушевич Д., Пейович Н.

По причине распространения векторных заболеваний и их значения для здоровья людей нами проведено исследование по определению превалентности антител к антигенам *Leishmania infantum* в образцах сыворотки крови у собак. Лейшманиоз является протозоозом, вызываемым видами *Leishmania*. По данным Всемирной организации здравоохранения существует постоянная угроза заболевания для 350 миллионов человек в 88 странах мира, а большинство стран Средиземноморья являются эндемичной территорией. Учитывая, что Черногория относится к странам бассейна Средиземного моря, очень важны результаты исследования присутствия антител к антигенам *L.infantum* в сыворотке крови собак, являющихся резервуаром и источником инфекции для человека.

В период с 2006 по 2010 год было исследовано 433 образца сыворотки крови собак с клиническими симптомами и 68 образцов сыворотки крови собак без симптомов заболевания. Обследуемые животные, как правило, имели видимые симптомы заболевания, преимущественно алопецию, потерю веса и лимфаденомегалию. В 66% случаях известен и гематологический профиль, в котором доминирует гипохромная анемия и нейтрофильный лейкоцитоз. Исследование включало и 68 собак в хорошей кондиции, у которых отсутствовали симптомы, в числе которых 45 служебных собак на службе в армии и полиции, а также 23 собаки из приюта.

Методом непрямой иммунофлуоресценции (IFAT) и реакции прямой агглютинации (DAT) определялось присутствие специфических антител к антигенам *L.infantum*. Положительный результат в разведении сыворотки 1: 160 установлен в 258 образцах



(59.58%) в группе собак с клиническими симптомами и в 5.9% у обследованных собак без симптомов. На части территории Черногории среднегодовая температура воздуха составляет 14,6-17,8°C со средиземноморским климатом с долгим, жарким и сухим летом и мягкой дождливой зимой, что является важным климатическим условием для сохранения и развития этой паразитарной инфекции. Установленное присутствие пяти видов *Phlebotomina* на территории Черногории, необходимых участников в цикле развития и сохранения видов *Leishmania*, с доминирующим видом *Phlebotomus neglectus* дополнительно подтверждает большой риск существования и сохранения заболевания. Полученные результаты исследования серопревалентности у собак коррелируют с результатами Института общественного здоровья по 55 зарегистрированным случаям висцерального лейшманиоза человека в период 1992-2009 г. Принимая во внимание, что серонегативный результат и отсутствие симптомов болезни не исключают наличие инфекции, а также то, что сероположительный результат не означает только наличие инфекции, высокий уровень серопревалентности (59.58%) у собак на городских территориях в Черногории на протяжении 5 лет является тревожным эпизоотическим и эпидемиологическим показателем.

Ключевые слова: *Leishmania*, собака, серопревалентность, Черногория