

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Emanuel Budicin

Hematološki parametri u kokoši nesilica nakon terapije tekuti pripravkom fluralaner

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za bolesti peradi s klinikom te na Zavodu za fiziologiju i radiobiologiju pod vodstvom doc.dr.sc. Željka Gottsteina i prof.dr.sc. Jasne Aladrović i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021..

SADRŽAJ:

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>3</b>
<b>ANTIPARAZITIK KORIŠTEN U ISTRAŽIVANJU .....</b>	<b>3</b>
<b>KOKOŠI PRAĆENE U ISTRAŽIVANJU.....</b>	<b>3</b>
<b>HEMATOLOŠKI PARAMETRI .....</b>	<b>4</b>
<b>STATISTIČKA ANALIZA .....</b>	<b>4</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>5</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>9</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>11</b>
<b>7. ZAHVALE .....</b>	<b>12</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>9. SAŽETAK .....</b>	<b>16</b>
<b>10. SUMMARY .....</b>	<b>17</b>

## 1. Uvod

Tekuti peradi uzrokuju jednu od najvažnijih ektoparazitoza koje utječu na svjetsku peradarsku industriju, i to poglavito u kokoši nesilica. Uzrokuju vrlo štetne promjene u nesilica, kao što su stres, anemija, pad nesivosti i pad kvalitete jaja (KAAB i sur., 2019.) što dovodi do narušavanja zdravlja i dobrobiti, a također predstavljaju i javnozdravstveni problem (AKBAYEV et al., 2020.). Postoji niz različitih vrsta tekuti, ali na području Europe najučestalija i najvažnija je kokošja tekut (*Dermanyssus gallinae*), koja ima vrlo visoku prevalenciju na farmama kokoši nesilica, pri čemu u pojedinim zemljama može doseći 90% invadiranih farmi (SIGOGNAULT FLOCHLAY i sur., 2017). Kokošja tekut je povremeni hematofagni ektoparazit, koji se, osim krvlju kokoši, hrani i krvlju drugih vrsta ptica kao što su purani, golubovi, kanarinci i divlje patke (BIĐIN, 2008), ali isto tako može invadirati i sisavce i ljude (ABD EL-HALIM i sur., 2009.). Najčešće se pojavljuju u toplim krajevima, naročito u peradnjacima s prečkama i peradnjacima s rasplodnim nesilicama tovni pilića u dubokoj stelji (BIĐIN, 2008). Obitavaju u raznim pukotinama i zaštićenim dijelovima različitih predmeta koji se nalaze u peradnjacima te iz njih izlaze tek nakon što padne mrak, kako bi se hranile s kokošjom krvlju svakih 2-4 dana (KILPINEN, 2005). Tijekom svog razvoja tekut prolazi kroz pet različitih stadija, počevši od jajašca, nakon čega slijede ličinke, protonimfe, deutonimfe te na poslijetku odrasla tekut (Pritchard i sur., 2015). Cijelokupan razvoj u prosjeku traje oko 14 dana, no u uvjetima od 25 do 35 °C i vlažnosti zraka od 80% razvoj može trajati samo 5,5 - 7 dana što dovodi do eksponencijalnog rasta populacije. Nakon parenja, ženka polaže 4 - 8 jajašaca, a tijekom cijeloga života može snesti oko 30 jaja (SPARAGANO I GIANGASPERO, 2009). Aktivnost im je najveća pet do jedanaest sati od početka mraka te u tom razdoblju pronalaze domaćina na kojemu se hrane u prosjeku 30 do 60 minuta. Krvlju se hrane protonimfe, deutonimfe i odrasle muške i ženske jedinice (PRITCHARD i sur., 2015). Kod invazija malog intenziteta uglavnom nema kliničkih znakova, ali invazije s 150000 do 200000 jedinki tekuti po domaćinu uzrokuju ozbiljnu kliničku manifestaciju (KILPINEN, 2005). Invazija tekutima uzrokuje različite promjene, uključujući jaki porast razine stresa (KOWALSKI i SOKOL, 2009) koja nastaje zbog neprestanih uboda koji dovode do dermatitisa, iritacije kože, jake svrbeži i nemira životinja (KOWALSKI i SOKOL, 2005, SIGOGNAULT FLOCHLAY i sur., 2017), pada nesivosti, anemije i porasta mortaliteta (CHAUVE, 1998, KILPINEN, 2005). Zadnjih nekoliko godina ovaj se ektoparazit sve više istražuje i zbog mogućeg vektorskog djelovanja u prijenosu različitih drugih uzročnika kao što su *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (PUGLIESE i sur.,

2019), drugih vrsta Salmonella, ptičje influence (TOMLEY i SPARAGANO, 2018), Coxiella burnetii i Borrelia burgdorferi, Chlamydophila spp., Rickettsia spp. i Bartonella spp. (RAELE i sur., 2018 ), ali i drugih zaraznih virusnih bolesti i bakterijskih septikemija, koje mogu biti i zoonoze (DE LUNA i sur., 2008, DECRU i sur., 2020).

Dugi niz godina u suzbijanju tekuti koristili su se razni sintetički akaricidi kojima su tretirani peradnjaci i oprema. Međutim obilno i dugotrajno korištenje dovelo je do razvoja rezistencije i smanjenja njihove učinkovitosti (BEUGNET i sur., 1997, SPARAGANO i sur., 2014). Zbog sve većeg značenja obrane od ovih ektoparazita i njihove rezistencije na dosadašnje akaricide, u zadnjih nekoliko godina traže se alternativni preparati koji bi bili učinkoviti u njihovom suzbijanju. To obuhvaća korištenje raznih bioloških akaricidnih preparata, vakcina na temelju esencijalnih komponenti antikoagulantnih sekreta i sekreta srednjeg crijeva *D. gallinae* (SCHICHT i sur., 2014, BARTLEY i sur., 2017, PRICE i sur., 2019 ) te korištenje biljnih esencijalnih ulja (IMMEDIATO i sur., 2016, TABARI i sur., 2017, LEE i sur., 2019). Osim toga, koriste se i različiti fizikalni postupci, kao što su toplina, prašina i svjetlost (SPARAGANO i GIANGASPERO, 2011, QUILICOT i sur., 2020). Većina navedenih alternativnih metoda su iznimno efikasne u alternativnoj i organskoj proizvodnji s manjim jatima peradi. Međutim, u intenzivnoj proizvodnji su se pokazali nepraktičnim i njihova je primjena ograničena zbog velikog broja jedinki, vrlo kompleksne opreme, različitih dobnih skupina u susjednim objektima i dr. (SCHULZ i sur., 2014). U uporabu se počinju uvoditi i različite kemijski sintetizirane tvari koje se primjenjuju per os putem pitke vode, kao što je fluralaner (Exzolt, MSD), koji se vrlo jednostavno i u kratkom roku može primjeniti u velikoj populaciji peradi (THOMAS i sur., 2017).

## 2. Opći i specifični ciljevi rada

Zbog postojanja vrlo oskudnih podataka o praktičnoj primjeni i djelotvornosti fluralanera u proizvodnji peradi opći cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak aplikacije fluralanera na hematološke pokazatelje i koncentraciju serumskog amiloida A u nesilica lake linije Lohmann Brown.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- utvrditi vrijednosti hematokrita, koncentracije hemoglobina, ukupnog broja eritrocita i leukocita prije (0. dan) i nakon provedene terapije s fluralanerom u vremenskim intervalima 7., 14, 21. i 60 dan
- utvrditi koncentraciju serumskog amiloida A prije (0. dan) i nakon provedene terapije s fluralanerom u vremenskim intervalima 7., 14, 21. i 60 dan
- monitoringom hematoloških parametara utvrditi postojanje anemije kao posljedice invazije tekutima te znakove regeneracije crvene krvne slike

## 3. Materijal i metode

### **Antiparazitik korišten u istraživanju**

Prilikom istraživanja korišten je komercijalni pripravak s djelatnom tvari fluralaner (Exzolt, MSD) namijenjen suzbijanju tekuti u peradi. Pripravak je korišten prema uputama proizvođača na način da je primijenjen putem pitke vode dvokratno u razmaku od sedam dana u dozi 0,5 mg/kg tjelesne mase kokoši.

### **Kokoši praćene u istraživanju**

Tijekom istraživanja praćeno je 2000 kokoši nesilica lake linije, Lohmann Brown, držane slobodno u volijerama. Pregledom farme utvrđena je značajna invadiranost objekta, što je uz prisutnost krvavih mrlja na ljuskama jaja i početak ljetnog razdoblja s visokim temperaturama, bila opravdana indikacija za početak terapije. Terapija je započela sa 38 tjedana starosti kokoši..

## **Hematološki parametri**

Tijekom praćenja terapije proveden je monitoring hematoloških parametara kokoši u jatu. Uzorci krvi s litijevim heparinom kao antikoagulansom i bez antikoagulansa uzeti su neposredno prije terapije te 7., 14., 21. i 60. dana nakon početka terapije. U uzorcima krvi određen je hematokrit (L/L), koncentracija hemoglobina (g/L), ukupan broj leukocita i ukupan broj eritrocita u roku 2 sata od uzorkovanja. Ugrušana krv je centrifugirana (1600xg, 15 minuta pri 20 °C na centrifugi 5920R (Eppendorf, Njemačka) te je izdvojen krvni serum i pohranjen na -20 °C do analize. U serumu je određena koncentracija proteina akutne faze serumskog amiloida A (SAA).

Hematokrit je određen mikrohematokritskom metodom u mikropilarama. Koncentracija hemoglobina određena je cijanmethemoglobinskom metodom gotovim kompletom tvrtke Randox (Irska), a vrijednosti su očitane na spektrofotometru Thermospectronic Helios delta (Unicam, Cambridge, Velika Britanija) pri 540 nm. Ukupan broj eritrocita i leukocita određen je direktnom metodom po Nattu i Hericku brojanjem u hemocitometru (Neubauerov hemocitometar). Vrijednosti SAA proteina određene su u serumu primjenom komercijalnog ELISA kita Chicken serum amyloid A (SAA) ELISA (Life Diagnostics, West Chester, SAD) prema uputama proizvođača. Vrijednosti absorbance očitane su na spektrofotometru  $\mu$ Quant (Bio-Tek Instruments, SAD), a koncentracije su preračunate pomoću internetske platforme Four Parameter Logistic Curve (MyAssays Ltd., <http://www.myassays.com>).

## **Statistička analiza**

Rezultati dobiveni analizama prvotno su testirani Kolmogorov-Smirnovljevim testom kako bi se utvrdila normalnost raspodjele podataka. Vrijednosti hematokrita, koncentracije hemoglobina i broja eritrocita testirane su Anova LSD testom, a broj leukocita i koncentracija SAA proteina testirane su Kruskal-Wallisovom analizom varijance i sumom rangova, primjenom računalnog programa Statistica 13 (Tibco, SAD). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

## 4. Rezultati

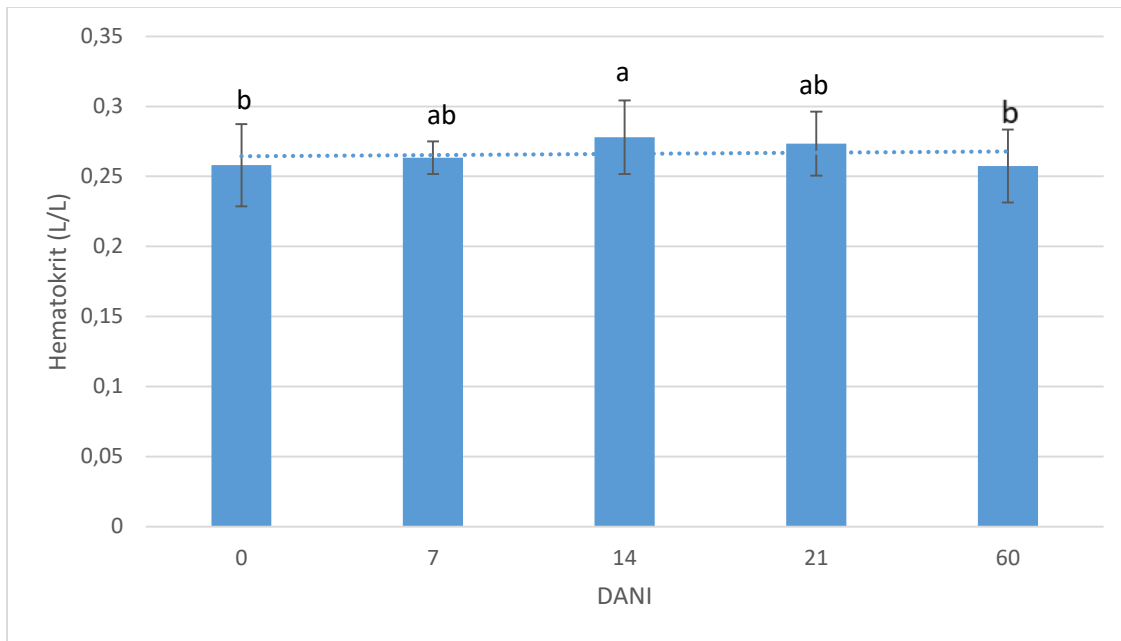
Rezultati analize hematoloških parametara prikazani su na četiri grafička prikaza. Na slici 1. grafički su prikazani rezultati usporedbe vrijednosti hematokrita (L/L) u razdoblju od početka tretiranja do 60. dana nakon početka primjene pripravka fluralaner. Statistička značajna razlika utvrđena je između nultog i 14. dana od početka tretiranja pri čemu dolazi do značajnog porasta vrijednosti hematokrita (Slika 1.). Slične vrijednosti hematokrita izmjerene su i 21. dana od aplikacije antiparazitika da bi nakon toga ponovno bio utvrđen značajan pad vrijednosti hematokrita. Slika 2. grafički prikazuje vrijednosti hemoglobina (g/L) po danima nakon početka terapije do 60. dana nakon početka. Statistički značajna razlika zabilježena je već nakon 7 dana. Osim toga statistički značajne razlike utvrđene su i kod vrijednosti između početka terapije i 14. dana kao i između 7. i 21. dana od početka tretiranja, nakon čega se razina hemoglobina nije značajno mijenjala i do 60 dana od početka terapije ostaje na razini od 86,58 g/L koja je značajno veća od početnih vrijednosti.

Ukupan broj eritrocita ( $\times 10^{12}/L$ ) utvrđen u razdoblju od 60 dana od početka tretiranja (Slika 3.) postupno se smanjuje do 60. dana od početka tretiranja, bez statistički značajnih razlika među danima.

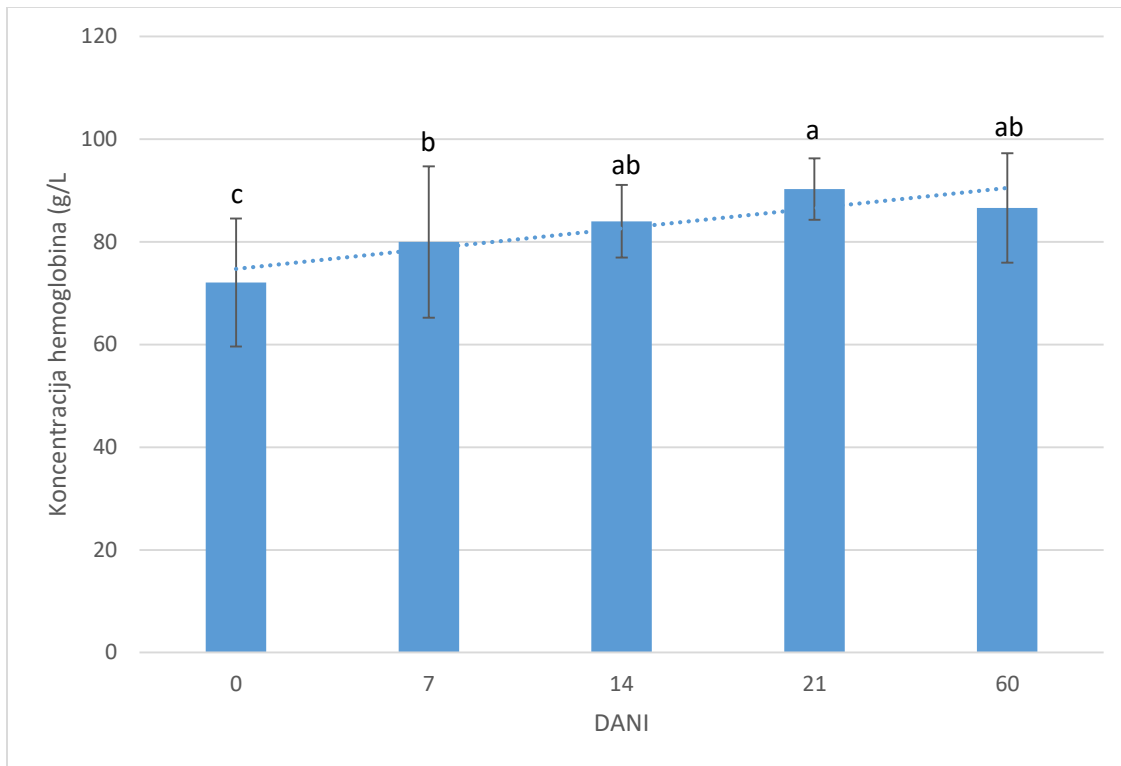
Ukupni broj leukocita ( $\times 10^9/L$ ) (Slika 4.) najveći je na početku tretiranja nakon čega se bilježi smanjenje broja leukocita. Utvrđene vrijednosti ne pokazuju statistički značajne razlike.

Vrijednosti SAA su prije početka terapije pa sve do 21. dana vrlo niskih vrijednosti i kreću se u rasponu od 0 do 4,88 ng/ml, da bi 60 dana nakon početka terapije došlo do statistički značajnog porasta vrijednosti na gotovo 55 ng/ml (Slika 5.).

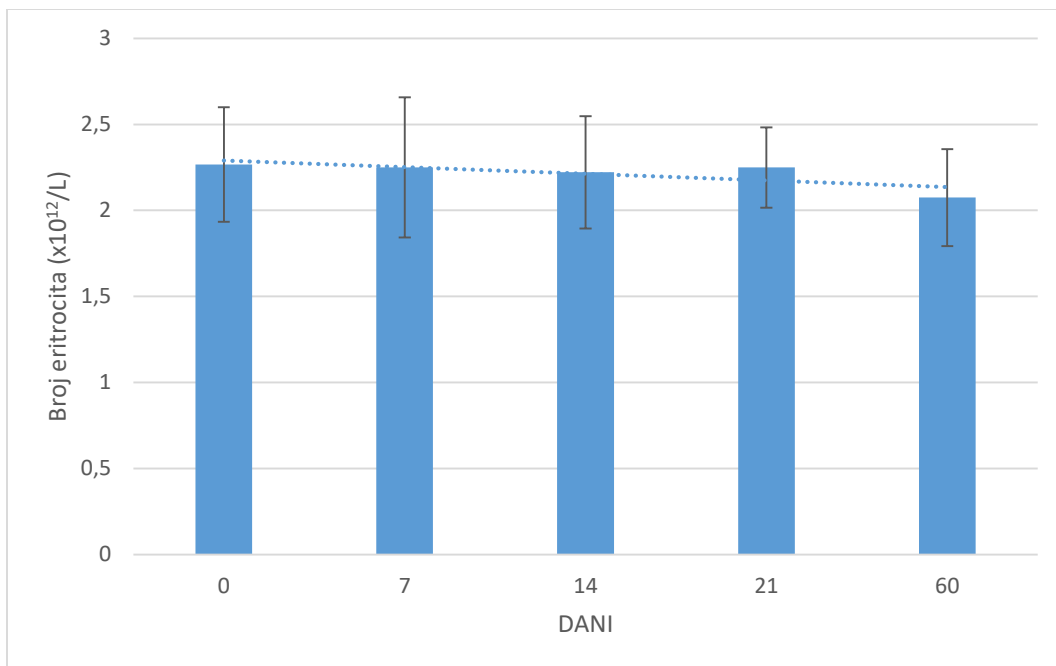




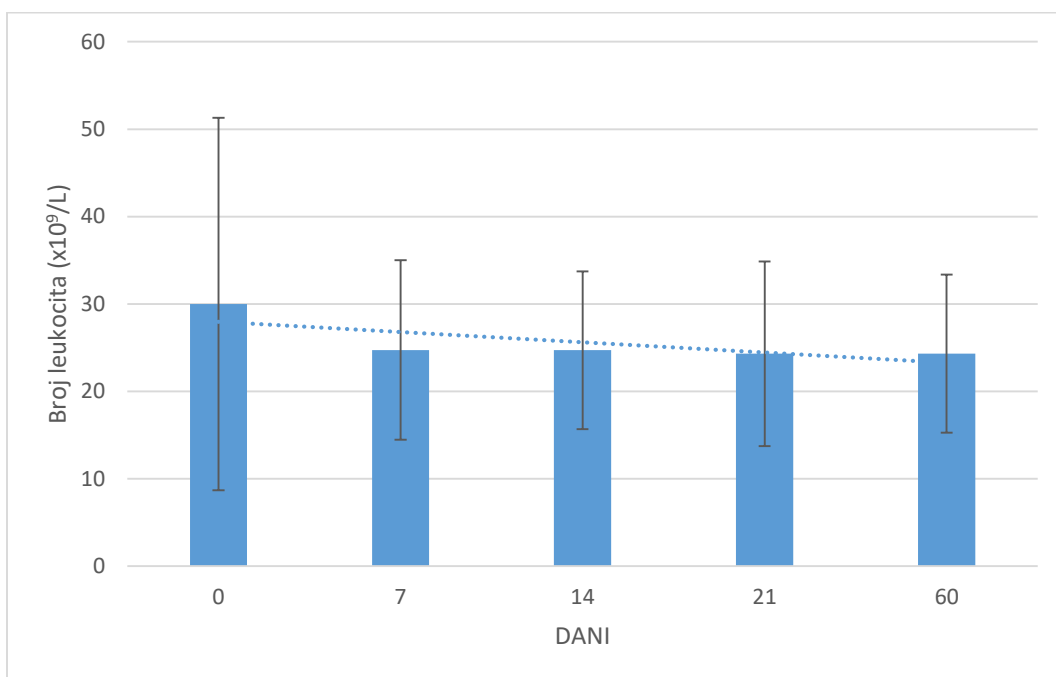
Slika 1. Vrijednosti hematokrita (L/L) (srednja vrijednost $\pm$ SD) po danima nakon početka terapije s naznačenom linearnom linijom trenda (.....). Statistički značajne razlike ( $p\leq 0,05$ ) između pojedinih dana označene različitim malim slovima abecede (a, b, c).



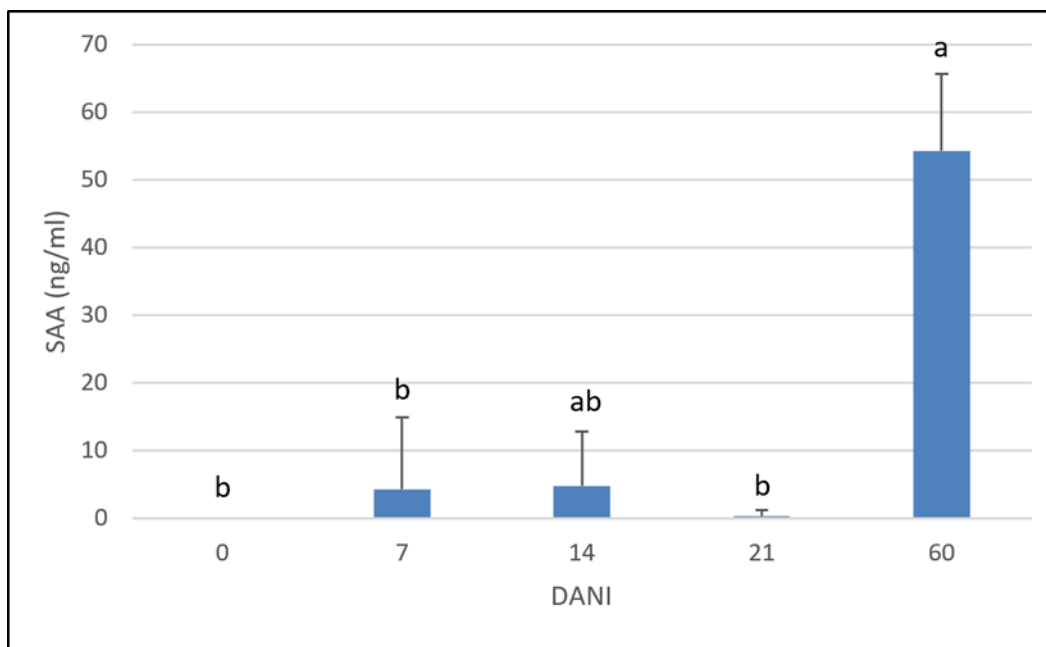
Slika 2. Koncentracija hemoglobina (g/L) (srednja vrijednost $\pm$ SD) po danima nakon početka terapije s naznačenom linearnom linijom trenda (.....). Statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) između pojedinih dana označene različitim malim slovima abecede (a, b, c, d).



Slika 3. Vrijednosti broja eritrocita ( $\times 10^{12}/L$ ) (srednja vrijednost $\pm$ SD) po danima nakon početka terapije s naznačenom linearnom linijom trenda (.....).



Slika 4. Vrijednosti broja leukocita ( $\times 10^9/L$ ) (srednja vrijednost $\pm$ SD) po danima nakon početka terapije s naznačenom linearnom linijom trenda (.....).



Slika 5. Vrijednosti serumskog amiloida A (srednja vrijednost  $\pm$  SD) u serumu kokoši (ng/ml) tijekom istraživanja.

## 5. Rasprava

Invazija tekutima predstavlja vrlo važan problem peradarske proizvodnje, naročito u Europi, gdje se očekuje veliki porast u populaciji ovoga parazita zbog promjena u stočarskoj legislativi, porasta akaricidne rezistencije, globalnog zagrijavanja i nedostatka održivog pristupa u kontroli invazije (AKBAYEV i sur., 2020.). Isti problem nastaje i u Hrvatskoj gdje je tekut sve češće prisutna na farmama peradi, naročito kokoši nesilica (HORVATEK TOMIĆ i sur., 2018).

U posljednje vrijeme u uporabu su ušli razni alternativni preparati na bazi prirodnih sastojaka, kao na primjer razna biljna esencijalna ulja ili mineralni silikatni pripravci, koji su se pokazali učinkoviti tek u manjoj mjeri zbog vrlo kratkog trajanja učinka što ne dovodi do većeg pada populacije tekuti (IMMEDIATO i sur., 2016, TABARI i sur., 2017, LEE i sur., 2019). Zbog potreba za adekvatnom terapijom, u uporabu se počinju ponovno uvađati različite kemijski sintetizirane tvari koje djeluju sistemski, kao što je fluralaner (Exzolt, MSD). Fluralaner se do sada koristio kao akaricidno sredstvo u kućnih ljubimaca koji se primjenjuje per os ili kao spot on pripravak gdje se pokazao veliku učinkovitost (DRYDEN i sur., 2015). Nedavno se taj pripravak pojavio i kao sredstvo za suzbijanje tekuti u kokoši, kao sistemski pripravak koji se primjenjuje

per os kroz vodu za piće, dvokratno kroz 7 dana, pri čemu su dobiveni vrlo zadovoljavajući učinci, pri čemu nema nuspojava niti karencije, što je vrlo važna činjenica u proizvodnji.

U ovom istraživanju, koristila se navedena terapija s pripravkom na bazi fluralanera (Exzolt, MSD) te su praćeni hematološki parametri i promjena vrijednosti 7., 14., 21. i 60. dana od početka terapije. Od hematoloških parametra pratile su se promjene vrijednosti hematokrita (L/L), hemoglobina (g/L), broja eritrocita ( $\times 10^{12}/L$ ), broja leukocita ( $\times 10^9/L$ ) i proteina akutne faze serumskog amiloida A. Vrijednosti hematokrita do 14. dana od početka tretiranja značajno su porasle, što se može izravno povezati s padom brojnosti tekući u jatu, koje se do 9. dana od početka terapije gotovo više ne nalaze u zamkama (GOTTSTEIN i sur., 2021.). Nakon dvokratne terapije u razdoblju od 7 dana, hematokrit zadržava više vrijednosti do 21. dana, pri čemu se 60. dana ponovno smanjio do razine prije tretiranja. Vrijednosti hemoglobina su također značajno porasle s početkom tretiranja jata, što se naročito moglo vidjeti 7., 14. i 21. dana mjerenja. Za razliku od hematokrita, razine hemoglobina su se dalje zadržavale na višim razinama do 60. dana mjerenja. Slične rezultate u mjerenju koncentracije hemoglobina dobili su i TEMPLE i sur. (2020) koji su mjerenje provodili prvog, drugog i šestog tjedna tretiranja te su izmjerili statistički značajno povećanje vrijednosti u prva 2 tjedna mjerenja. S druge strane broj eritrocita je postupno padao, sve do 60. dana nakon tretiranja, ali bez značajnih razlika među uzorkovanjima, pri čemu se vrijednosti zadržavaju u fiziološkim granicama (WAKENELL, 2010). To se može objasniti činjenicom da tijekom velike invazije tekućima, dolazi do aktivacije kompenzatornih mehanizama koji dovode do pojačanog stvaranja i otpuštanja eritrocita, kako bi se nadoknadio nagli gubitak, ali s nešto nižim vrijednostima hemoglobina u njima. Nakon smanjenja populacije parazita, kompenzatorni mehanizmi jenjavaju, što uzrokuje pad ukupnog broja eritrocita u krvi, ali je količina hemoglobina u njima veća. Na posljeticu, određen je i broj ukupnih leukocita u krvi invadiranih kokoši te je utvrđeno da su u prvom mjerenju te vrijednosti gotovo  $30 \times 10^9 /L$ , koji je nakon provedene terapije uvelike pao, što se može uočiti već 7. dana. Navedeni rezultati u broju leukocita su bili i očekivani zbog traumatizacije tkiva uzrokovanih hranjenjem tekući kao i stresa samih domaćina koji nastaje djelovanjem tekući. Uz navedeno vrlo značajan čimbenik poticanja više razine leukocita je i vjerojatan ulazak infekta u organizam ubodima tekući, što posljedično rezultira sistemskim upalnim stanjem. Navedeni pad broja eritrocita može biti povezan i s padom broja leukocita, odnosno zbog pada aktivnosti leukocita dolazi i do smanjene citokinske stimulacije na aktivaciju diobe stanica što posljedično rezultira i padom broja eritrocita. U

istraživanju koje su proveli TEMPLE i suradnici (2020) nije bilo značajnih promjena u broju eritrocita i leukocita. Zabilježili su tek vrlo slabi rast broja eritrocita nakon prvog tjedna tretiranja, ali se ta razina u šestom tjednu nakon početka terapije ponovno spustila na početne vrijednosti. S druge strane broj leukocita je padao sve do šestog tjedna nakon terapije, no u značajno manjoj mjeri nego što je to utvrđeno u ovom istraživanju.

Vrijednosti SAA proteina pokazuju niske vrijednosti prije početka terapije te neznatne varijacije do 21. dan od početka terapije, da bi 60. dana one značajno porasle. Ranija istraživanja unosom infekta pokazuju višestruki porast ekspresije SAA proteina nakon akutne zaraze npr. salmonelama (MATULOVA i sur., 2013) s vrhuncem oko 4. dana, da bi se razina ekspresije do 12. dana vratila na početne vrijednosti. U slučaju praćenja akutne invazije tekutima, vrijednosti SAA proteina su postupno značajno porasle od početka invazije u dobi 12 tjedana do dobi 31 tjedna s ispod 10 ng/ml na skoro 50 ng/ml, da bi potom postupno počele padati (KAAB i sur., 2019). Kako je ovaj protein pokazatelj akutne zaraze u ovom istraživanju očekivano viša razina nije utvrđena na početku terapije, kao posljedica kontinuiranog unosa infekta. Moguće je posljedica kronične stimulacije kod koje nema akutnog poticanja te s obzirom na dob od 38 tjedana i visoku invaziju vrijednosti SAA proteina su niske, ili su moguće ubodi tekuti sterilni što je teško za očekivati. S druge strane, očit je zarazni akutni inzult nakon 60 dana i nagli porast SAA vrijednosti, iako nisu uočeni nikakvi klinički znakovi prilikom posjeta farmi.

## 6. Zaključak

Ovo istraživanje provedeno je s ciljem praćenja invadiranih kokoši nesilica lake pasmine u proizvodnji prije i nakon provedene terapije sa sistemskim akaricidnim preparatom koja sadrži fluralaner, praćenjem hematoloških parametara kao pokazatelja stanja anemije i sposobnosti regeneracije u fiziološke granice. Pad broja tekuti nakon primjene fluralanera praćeno je i brzim poboljšanjem hematoloških parametara, poglavito s vrijednostima hematokrita, hemoglobina i brojem leukocita, i njihovim vraćanjem u fiziološke granice. Na temelju ovih podataka možemo zaključiti da se fluralaner efikasno može koristiti u kontroliranju invazije tekutima i održavanju dobrog zdravstvenog stanja i proizvodnosti kokoši nesilica na farmama.

## 7. Zahvale

Zahvaljujem mentorima doc. dr. sc. Željku Gottsteinu i prof. dr. sc. Jasni Aladrović na strpljenju i stručnom vodstvu pri izradi ovog rada.

## 8. Literatura

ABD EL-HALIM, A. S., K. A. ALLAM, A. M. METWALLY, A. M. EL BORAIEY (2009): Seasonal variation of infestation rate with lice, tick and mite among rodents in certain Egyptian regions. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 39, 617-624.

AKBAYEV R. M., A. S. BELOUS, E. V. TRUBNIKOVA, E. S. BOGDANOVA, A. V. BELYAKOVA, E. Y. EPOVA, M. V. ZYLKOVA, Y.K. BIRYUKOVA, A. B. SHEVELEV (2020.): Impact of Poultry Red Mite (*Dermanyssus gallinae*) Infestation on Blood Parameters of Laying Hens. *BioNanoScience* 10, 318-329.

BARTLEY, K., F. TURNBULL, H. W. WRIGHT, J. F. HUNTLEY, J. PALAREA ALBALADEJO, M. NATH, A. J. NISBET (2017). Field evaluation of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) native and recombinant prototype vaccines. *Veterinary Parasitology* 244, 25–34.

BEUGNET, F., C. CHAUVE, M. GAUTHEY, and L. BEERT (1997): Resistance of the red poultry mite to pyrethroids in France. *Vet. Rec.* 140, 577–579.

CHAUVE, C. (1998): The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Vet. Parasitol.* 79, 239–245.

DECRU, E., M. MUL, A. J. NISBET, A.H. VARGAS NAVARRO, G. CHIRON, J. WALTON, T. NORTON, L. ROY, N. SLEECKX (2020): Possibilities for IPM Strategies in European Laying Hen Farms for Improved Control of the Poultry Red Mite (*Dermanyssus gallinae*): Details and State of Affairs. *Front. Vet. Sci.* 7, 565866

DE LUNA, C. J., S. ARKLE, D. HARRINGTON, D. R. GEORGE, J. H. GUY, O. A. E. SPARAGANO (2008): The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* as a potential carrier of vector-borne diseases. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1149, 255-8.

DRYDEN M. W., V. SMITH, T. BENNET, L. MATH, J. KALLMAN, K. HEANEY, F. SUN (2015); Efficacy of fluralaner flavored chews (Bravecto®) administered to dogs against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis felis* and egg production. *Parasites & Vectors* 8, 364 DOI 10.1186/s13071-015-0965-4

GOTTSTEIN Ž., L. LOZICA, I. SABOLEK, J. MILJKOVIĆ, M. OSTOVIĆ, J. ALADROVIĆ, A. SHEK-VUGROVEČKI, D. HORVATEK TOMIĆ (2021): Field efficacy of fluralaner solution in mite control on poultry farms. *Hrvatski veterinarski vjesnik* 29(1), 37-42.

HORVATEK TOMIĆ, D., Ž. GOTTSTEIN, Ž. ERVAĆINOVIĆ, M. LUKAČ, E. PRUKNER-RADOVČIĆ (2018): Poultry red mite in Croatia – preliminary results from the WG1 questionnaire. *Scientia parasitologica*, 19 (S.I.), 47-48.

IMMEDIATO, D., L. A. FIGUEREDO, R. IATTA, A. CAMARDA, R. L. N. DE LUNA, A. GIANGASPERO, S. P. BRANDAO -FILHO, S. P., D. OTRANTO, C. CAFARCHIA (2016). Essential oils and *Beauveria bassiana* against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae): towards new natural acaricides. *Veterinary Parasitology* 229, 159–165.

KAAB, H, M. M. BAIN, K. BARTLEY, F. TURNBULL, H. W. WRIGHT, A. J. NISBET, R. BIRCHMORE, P. D. ECKESALL (2019): Serum and acute phase protein changes in laying hens, infested with poultry red mite. *Poultry Science* 98 (2), 679-687.

KILPINEN, O. (2005): How to obtain a bloodmeal without being eaten by a host: the case of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Physiol. Entomol.* 30, 232–240.

KOWALSKI, A, R. SOKOL (2005): Influence of *Dermanyssus gallinae* (poultry red mite) invasion on the plasma levels of corticosterone, catecholamines and proteins in layer hens. *Polish J Vet Sci.* 12, 231-5.

LEE, S. J., H. K. KIM, G. H. KIM (2019). Toxicity and effects of essential oils and their components on *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Experimental & Applied Acarology* 78(1), 65–78.

MATULOVA M, VARMUZOVA K, SISAK F, HAVLICKOVA H, BABAK V, STEJSKAL K, ZDRAHAL Z, RYCHLIK I. (2013): Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Vet Res.* 44(1), 37. doi: 10.1186/1297-9716-44-37.



PRICE, D. R. G., T. KUSTER, Ø. ØINES, E. M. OLIVER, K. Bartley, F. NUNN, J.F. LIMA BARBERO, J. PRITCHARD, E. KARP-TATHAM, H. HAUGE, D.P. BLAKE, F.M. TOMLEY, A.J. NISBET (2019). Evaluation of vaccine delivery systems for inducing long-lived antibody responses to *Dermanyssus gallinae* antigen in laying hens. *Avian Pathology* 48(sup1), S60-S74. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1612514>.

PUGLIESE, N., E. CIRCELLA, M. MARINO, C. DE VIRGILIO, G. COCCIOLO, P. LOZITO, M. A. CAFIERO, & A. CAMARDA (2019). Circulation dynamics of *Salmonella enterica subsp. enterica ser. Gallinarum biovar Gallinarum* in a poultry farm infested by *Dermanyssus gallinae*. *Medical and Veterinary Entomology* 33(1), 162–170.

QUILICOT, A., Ž. GOTTSTEIN, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, D. HORVATEK TOMIĆ (2020): Plant-derived products for the control of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) De Geer, 1778) – a review. *World Poultry Sci J.* 75, 1-13.

RAELE, D. A., D. GALANTE, N. PUGLIESE, G. LA SALANDRA, M. LOMUTO, M. A. CAFIERO (2018): First report of *Coxiella burnetii* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in poultry red mites, *Dermanyssus gallinae* (Mesostigmata, Acari), related to urban outbreaks of dermatitis in Italy. *New Microbes and New Infections* 23, 103–109.

SCHICHT, S., Q., W., L. POVEDA, C. STRUBE (2014); Whole transcriptome analysis of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778). *Parasitology* 141(3), 336–346.

SIGOGNAULT FLOCHLAY, A., E. THOMAS, O. A. E. SPARAGANO (2017): Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: a broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasites Vectors* 10, 357.

SPARAGANO, O. A. E., A. GIANGASPERO (2011): Parasitism in egg production systems: the role of the red mite (*Dermanyssus gallinae*). U: *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Egg Chemistry, Production and Consumption.* (Ur: Y. Nys, M. Bain, F. Van Immerseel), Woodhead Publishing Limited, 394-414.

SPARAGANO, O. A. E., D. R. GEORGE, D. W. J. HARRINGTON, and A. GIANGASPERO (2014): Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus*

*gallinae*. U: Annual Review of Entomology, vol. 59. (Ur. M. R Berenbaum) Annual Reviews, Palo Alto Pages, 447–466.

TABARI, M. A., M. R. YOUSEFFI, G. BENELLI (2017). Eco-friendly control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Dermanyssidae), using the alpha-thujone-rich essential oil of *Artemisia sieberi* (Asteraceae): toxic and repellent potential. Parasitology Research 116(5), 1545–1551.

TEMPLE D., X. MANTECA, D. ESCRIBANO, M. SALES, E. MAINAU, E. ZSCHIESCHE, I. PETERSEN, R. DOLZ. E. THOMAS (2020): Assessment of laying-bird welfare following acaricidal treatment of a commercial flock naturally infested with the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). PLoS ONE 15(11): e0241608.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241608>

THOMAS, E., M. CHIQUET, B. SANDER, E. ZSCHIESCHE, A. S. FLOCHLAY (2017): Field efficacy and safety of fluralaner solution for administration in drinking water for the treatment of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestations in commercial flocks in Europe. Parasites Vect. 10, 457.

TOMLEY, F. M., O. SPARAGANO (2018): Spotlight on avian pathology: red mite, a serious emergent problem in layer hens. Avian Pathology 47(6), 533–535.

WAKENELL, P. S. (2010): Hematology of Chickens and Turkeys. U: Schalm's veterinary hematology. Ur.: WEISS, D. J., K. J. WARDROP, John Wiley & Sons, Ltd., Publication, Blackwell Publishing Ltd, 6th ed., 958-967.

## 9. Sažetak

### **Hematološki parametri u kokoši nesilica nakon terapije tekuti pripravkom fluralaner**

Emanuel Budicin, student VI. Godine

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Tekuti peradi su jedna od najvažnijih ektoparazitoza koje utječu na svjetsku peradarsku proizvodnju, i to poglavito u kokoši nesilica. Najčešća je tekut (*Deramanyssus gallinae*) koja je sposobna uzrokovati vrlo štetne promjene u nesilica, kao što su stres, anemija, pad nesivosti i lošiju kvalitetu jaja. Zbog sve većeg značenja obrane od ovih ektoparazita uslijed njihove rezistencije na dosadašnje akaricide, u zadnjih nekoliko godina traže se alternativni preparati koji bi bili učinkoviti u njihovom suzbijanju. Iz tog razloga se danas počinju koristiti i različiti kemijski pripravci koje se primjenjuju per os putem pitke vode, kao što je fluralaner (Exzolt, MSD), koji se vrlo jednostavno i u kratkom roku može primjeniti u velikoj populaciji peradi. Zbog postojanja vrlo oskudnih podataka o praktičnoj primjeni i djelotvornosti fluralanera, cilj ovog istraživanja bio je praćenje invadiranih kokoši nesilica lake pasmine u proizvodnji prije i nakon provedene terapije s fluralanerom monitoringom hematoloških parametara kao pokazatelja stanja anemije i brzine njihova povratka u fiziološke granice. Pripravak je primjenjen prema uputi proizvođača u dozi 0,5 mg po kilogramu tjelesne mase kokoši putem vode za piće, dvokratno s razmakom od sedam dana. Od hematoloških parametara određivali su se hematokrit (L/L), ukupni hemoglobin (g/L), broj leukocita i broj eritrocita iz uzoraka krvi s antikoagulansom te serumski amyloid A protein u serumu krvi uzete neposredno prije terapije te 7, 14, 21 i 60 dana nakon početka terapije. Dobiveni rezultati pokazuju da je s padom broja tekuti nakon provedene terapije došlo do statistički značajnog poboljšanja vrijednosti hematoloških parametara, naročito hematokrita, hemoglobina i broja leukocita, već u periodu od dva tjedna. Vrijednosti serumskog amiloida A nisu ukazale na prisustvo akutne zaraze prije početka terapije, kao niti do 21 dan nakon, no vrijednosti rastu do 60 dana nakon terapije ukazujući na moguću pojavu akutne subkliničke zaraze. Navedena terapija je vrlo brzo dovela do oporavka invadiranih kokoši vraćanjem mjerenih vrijednosti u fiziološke

granice, te smanjenja stresa, što se izravno odrazilo na perzistenciju u proizvodnji jaja do kraja proizvodnog ciklusa.

**Ključne riječi:** kokoši, tekuti, anemija, fluralaner, terapija, hematologija.

## 10. Summary

### **Haematological parameters of laying hens after treating poultry mites with fluralaner**

Emanuel Budicin, 6th year student


University of Zagreb, Faculty of Veterinary medicine, Zagreb, Croatia

Poultry mites are one of the most important ectoparasitic diseases that affect the global poultry production, especially the laying hens. The most common red poultry mite (*Dermanyssus gallinae*) is able to induce very harmful changes in laying hens, such as stress, anaemia, drop in egg production and lower egg quality. Due to the growing importance of prevention of infestations with these ectoparasites and their problem of resistance to the old acaricides, in the last few years new alternative products against them have been tested. That is why nowadays different synthetic chemicals, as fluralaner (Exzolt, MSD), that can be administered easily and in a short period of time orally via drinking water in a large poultry population, are starting to be used. Due to a lack of data of the practical usage and effectiveness of fluralaner, the aim of this study was to monitor the infested laying hens in egg production before and after the treatment with fluralaner by evaluating the haematological parameters as indicators of anaemia and the amount of time needed for them to go back to their physiological range. The product was administered according to the manufacturer instructions orally via drinking water twice, 7 days apart, at a dose of 0.5 mg per kg of live body weight. Among the haematological parameters hematocrit (L/L), hemoglobin (g/L), the number of leukocytes and erythrocytes were determined from anticoagulated whole blood samples and serum amyloid A from serum samples drawn before treatment with fluralaner and 7, 14, 21, and 60 days after the start of treatment. The results of this study indicate that with the reduction of poultry mites' numbers, after the treatment with fluralaner, there was a direct

significant improvement of hematological parameters, especially hematocrit, hemoglobin and leukocyte numbers, already within two weeks. Serum amyloid A values didn't show indication of any acute infection before treatment, or within 21 days after, but values rise 60 days after the treatment showing some acute subclinical infection. Analyzed treatment quickly improved health of infested hens returning the hematological values in the physiological range, and with stress reduction enabled the persistency in egg production till the end of production cycle.

**Key words:** chickens, poultry mites, anaemia, fluralaner, treatment, hematology.

Prilog: Riješenje Povjerenstva za etiku u veterinarstvu.



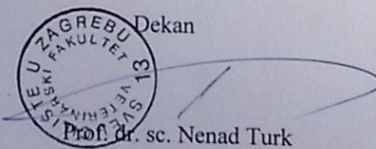
**Sveučilište u Zagrebu**  
**Veterinarski fakultet**  
Klasa: 640-01/21-02/06  
Ur. broj: 251-61-01/139-21-23  
Zagreb, 24. svibnja 2021.

Fakultetsko vijeće Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu temeljem članka 40. Statuta Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, na 8. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća u akademskoj godini 2020/21. održanoj u elektronskom obliku dana 19. svibnja 2021. godine, donijelo je sljedeću

**ODLUKU**

I. Prihvaća se molba Emanuela Budicina od 3. svibnja 2021. godine (klasa: 640-01/21-17/47; ur. br.: 251-61-41-21-01) kojom od Povjerenstva traži suglasnost o etičkoj prihvatljivosti za istraživanja uzoraka na koje se ne primjenjuje Zakon o zaštiti životinja (NN 102/2017) pod naslovom „Hematološki parametri u kokoši nesilica nakon terapije tekuti pripravkom fluralaner“ u svrhu izrade znanstvenog studentskog rada.

II. Ova odluka stupa na snagu danom njenog donošenja.

  
Dekan  
Prof. dr. sc. Nenad Turk

Dostaviti:

1. Emanuel Budicin
2. prof. dr. sc. Jasna Aladrović
3. doc. dr. sc. Željko Gottstein
4. Fakultetsko vijeće
5. Povjerenstvo za etiku o veterinarstvu

ul. Vjekoslava Heinzela br. 55, 10000 Zagreb - Tel.: (01) 2390 111 - Faks: (01) 2441 390 - e-pošta: [info@vef.hr](mailto:info@vef.hr) - <http://www.vef.unizg.hr>  
MB: 32257 55 – Žiro-račun: 2360000-1101354554 Zagrebačka banka d.d. – OIB: 36389528408

