

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet

Irena Reil

Morfološka karakterizacija bičaća *Trypanosoma rotatorium* te njegova unakrižna reaktivnost s protutijelima protiv bičaća *Leishmania infantum*

Zagreb, 2012.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom pod vodstvom Franje Martinkovića, DVM i predan je na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011/2012.

SADRŽAJ

UVOD	1
OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	10
MATERIJAL I METODE RADA	11
Morfologija, broj krvnih oblika <i>T. rotatorium</i>, bijela krvna slika	11
<i>In vitro</i> uzgoj, indirektna imunofluorescencija	11
REZULTATI	13
Morfologija, broj krvnih oblika <i>T. rotatorium</i>, bijela krvna slika	13
<i>In vitro</i> uzgoj, indirektna imunofluorescencija	14
RASPRAVA	24
ZAKLJUČCI	27
LITERATURA	28
SAŽETAK	32
SUMMARY	33
ŽIVOTOPIS	34

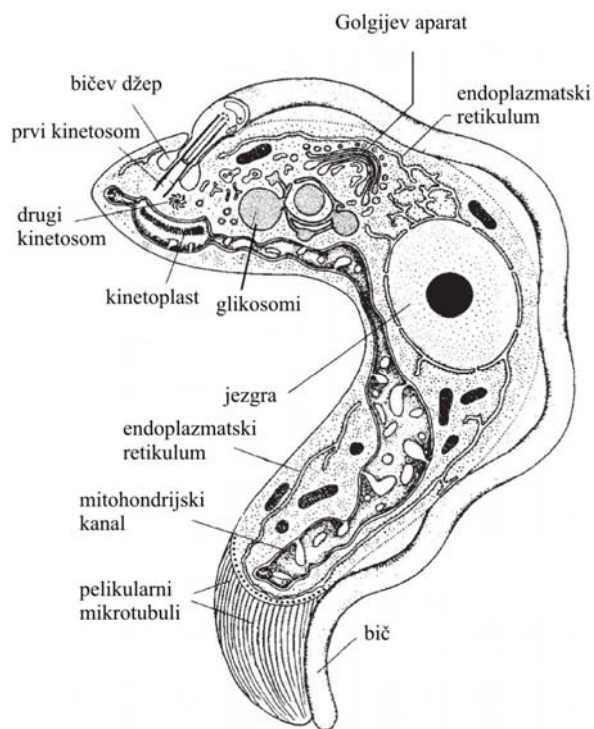
UVOD

Razred Kinetoplastida sadrži vrste koje parazitiraju u svemu - od ljudi do biljaka. Članovi razreda su karakterizirani velikim mitohondrijem u tijelu – kinetoplastom – koji se boji tamno u histološkim preparatima. Kinetoplast se nalazi iza kinetosoma na bazi biča i zajedno sa okolnim dijelovima mitohondrija ostaje u većoj ili manjoj povezanosti sa kinetosomom tijekom cijelog razvojnog ciklusa parazita. Kinetoplast je organela oblika diska unutar mitohondrija, koja sadrži DNA. Dna kinetoplasta (kDNA) je organizirana u mrežu povezanih krugova, drugačije nego je to u kromosomskoj DNA. Postoji i do 20 tisuća malih krugova (mini-krugova) i 20-50 većih krugova (maxi-krugova) u kinetoplastovoj mreži. Većina slika slikanih sa elektronskim mikroskopom ne pokazuje fizičku povezanost između kinetosoma i kinetoplasta, a priroda njihove povezanosti je nepoznata. Nadalje, uz njihovu različitu mitohondrijsku strukturu, kinetoplastidi još imaju citoskelet (stanični kostur) koji se sastoji od mikrotubula poredanih pravilno ispod plazmine ovojnice. Druge karakteristike uključuju još poveći bičev džep i rešetkasti kristalni paraksijalni štap duž aksoneme koji ima kratke izdanke povezane sa aksonemskim mikrotubulima, undulirajuću membranu (ovisno o vrsti) i katkad prominirajući glikokaliks ili površinski omotač koji je vidljiv sa elektronskim mikroskopom. Zaključno, kinetoplastidi imaju druge dvije jedinstvene osobine: glikosome – organele gdje se

odvija glikoliza (Slika 1).

Pojedini rodovi razlikuju se znatno u njihovoj rasprostranjenosti domaćina, životnom ciklusu, medicinskoj i/ili veterinarskoj značajnosti.

Razlikujemo dvije porodice: *Bodonidae* (red: *Bodonida*, koprozoični i slobodno živući ili paraziti riba i beskralježnjaka) i *Trypanosomatidae* (red: *Trypanosomatida*) od kojih su neki pripadnici vrlo važnih ljudskih i veterinarskih patogena.



2004.).

Slika 1. Shematski prikaz građe bičaša iz roda *Trypanosoma* (ROBERTS i sur.,

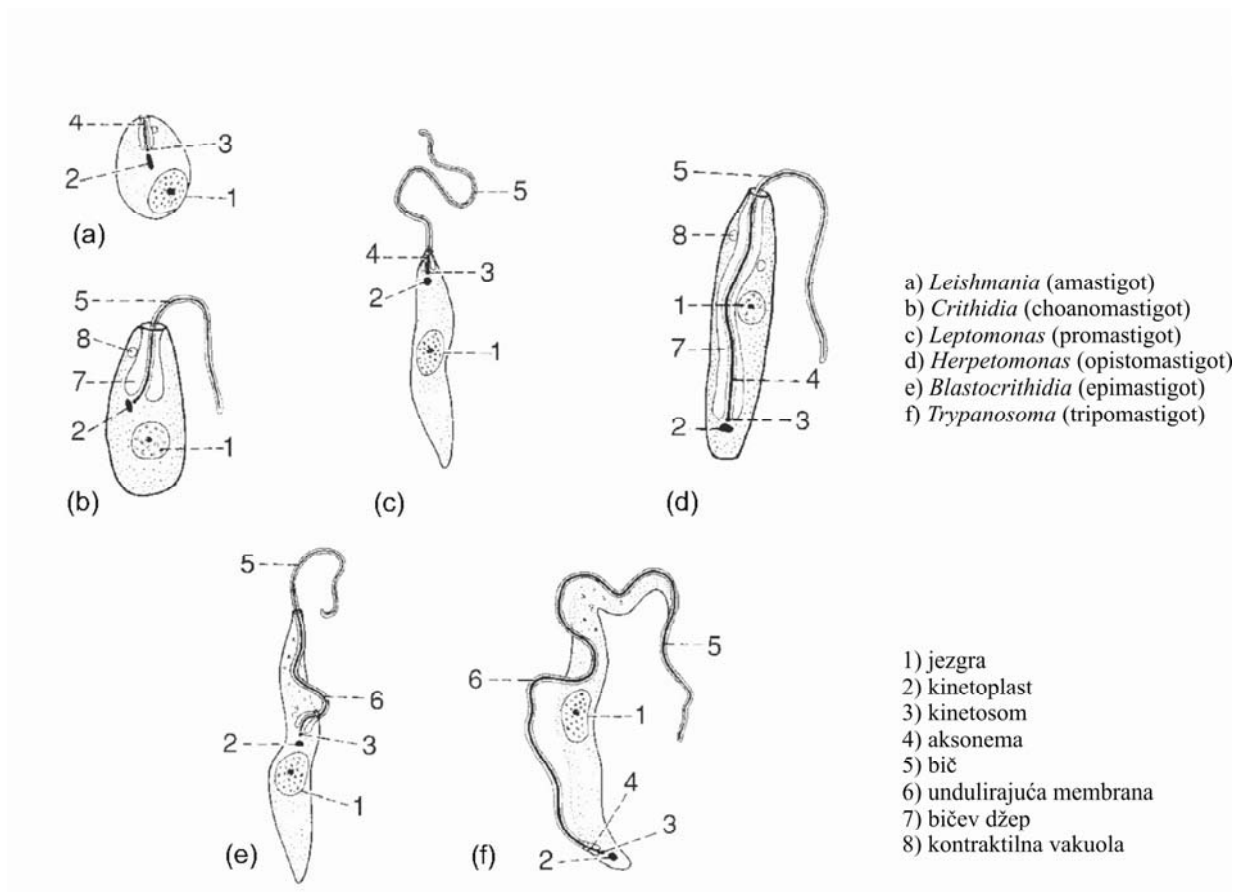
FAMILIA: *Trypanosomatidae*

Sve vrste porodice *Trypanosomatidae* imaju jednu jezgru te su ili izduženi sa jednim bičem ili okrugli, sa vrlo malim, neprominirajućim bičem. Mnogi pripadnici porodice su heterokseni, tj. tijekom jednog životnog stadija žive u krvi i/ili vezivnom tkivu kralježnjaka, a tijekom drugog žive u crijevu hematofagnih insekata. Nadalje, laboratorijske podloge za uzgoj istih obično moraju sadržavati krv pa ih zato i nazivamo krvnim bičašima.

Spolno razmnožavanje nije rutinski zamijećeno pa je većina populacija vrlo vjerojatno zbirka klonova. No ipak postoji određeni broj indirektnih dokaza o njihovoj spolnoj razmjeni genetskog materijala.

Trypanosomatidi su, moguće prije, originalno parazitirali u probavnom traktu insekata i pijavica, no znanstvenici su predložili alternativni scenarij gdje su kralježnjaci originalni domaćini. Iako su neke vrste još uvijek monoksene – koje parazitiraju unutar jednog artropodnog domaćina – većina tripanosomatida je heteroksena i prolazi kroz različite morfološke oblike, koji ovise o njihovom životnom ciklusu i domaćinu u kojem parazitiraju. U prošlosti ti oblici su nazivani prema rodovima gdje najčešće parazitiraju, npr. leptomonadni oblik za rod *Leptomonas*, no sada koristimo nazivlje s obzirom na mjesto kinetoplasta i jezgre, pa tako razlikujemo više oblika (Slika 2).

Tripomastigotni oblik je karakterističan za krvne oblike roda *Trypanosoma* isto kao i za invazivne metacikličke oblike u vektoru. Kod tripomastigota i kinetoplast i kinetosom su blizu zadnjeg kraja tijela, a bič ide uzduž cijele površine tijela i završava kao slobodni bič na početku tijela. Bičeva membrana je usko povezana sa površinom tijela pa kad se bič pomiče, to područje pelikule je izvučeno u nabor. Bič i nabor sačinjavaju undulirajuću membranu. Drugi „goli“ kinetosom bez biča obično se nalazi blizu bičevog kinetosoma. U tipičnog krvnog oblika tripomastigota, jednostavni mitohondrij sa tubularnim kristama ili bez njih izlazi iz kinetoplasta. U stadiju u insektu, mitohondrij je puno veći i puno složenije građe, sa lamelarnim kristama. Na bazi biča, okružujući kinetosom, nalazi se bičev džep. Sustav pelikularnih mikrotubula okružuje tijelo te se nalazi odmah ispod stanične membrane. Grubi endoplazmatski retikulum je dobro razvijen, a Golgijev aparat leži između jezgre i kinetosoma. Drugi oblici tijela u tripanosoma razlikuju se u obliku, mjestu kinetosoma i kinetoplasta, razvijenosti biča ili obliku bičevog džepa. Sferični amastigotni oblik javlja se u životnom ciklusu nekih vrsta i tipičan je za rod *Leishmania*. Maleni, 2-3 mikrona, amastigoti *Leishmania* su jedni od najmanjih stanica eukariota. Bič je vrlo kratak, prominira samo malo izvan bičevog džepa. U promastigotnom obliku bič se ispružuje prema naprijed kao



Slika 2. Shematski prikaz pojedinih rodova i oblika bičaša iz porodice *Trypanosomatidae* (ROBERTS i sur., 2004.).

funkcionalna organela. Kinetosom i kinetoplast su smješteni ispred jezgre, blizu prednjeg kraja tijela. Promastigotni oblici su pronađeni u nekoliko razvojnih ciklusa za vrijeme kad su u domaćinima insektima. To je odrasli oblik roda *Leptomonas*. Ako bič izlazi kroz široki džep, oblika ovratnika, taj oblik nazivamo hoanomastigotni, koji je pronađen u nekih vrsta iz roda *Crithidia*.

Epimastigotni oblik javlja se u nekim životnim ciklusima. Ovdje su kinetoplast i kinetosom smješteni još uvijek između jezgre i prednjeg dijela, ali kratka undulirajuća membrana leži dužinom proksimalnog dijela biča. Rodovi *Crithidia* i *Blastocrithidia*, oba paraziti insekata, očituju taj oblik tijekom njihovih razvojnih ciklusa. Konačno, paramastigotni i opistomatigotni oblici su nađeni u rodu *Herpetomonas*, velikoj grupi parazita insekata koji se javljaju uglavnom u muha (red *Diptera*). U paramastigota je kinetosom i kinetoplast iza jezgre, a u opistomastigota su te organele smještene između jezgre i stražnjeg kraja, ali nema

undulirajuće membrane, a bič probada dugi rezervoar koji prolazi cijelom dužinom tijela i otvara se na prednjem dijelu. U rodu *Herpetomonas* razmnožavanje se javlja samo u promastigotnom obliku, gdje se ostali oblici tijela javljaju nakon što je populacija dostigla maksimum, kao npr. u *in vitro* hranjivim podlogama. Unatoč njihovoj jasnoj strukturnoj jednostavnosti, tripanosomatidi su u biti potpuno drugačiji, što se manifestira u ultrastrukturnim osobinama i unutarnjoj distribuciji (raspoređenosti) organela (Slika 2).

Životni ciklus tripanosomatida također varira s obzirom na vrste domaćina, vektore, ponašanje parazita u vektoru i u domaćinu kralježnjaku, stadijima životnog ciklusa gdje se javlja razmnožavanje. *Leptomonas* ima najjednostavniji životni ciklus u kojem je insekt jedini domaćin, razmnožavanje je u crijevu insekta u promastigotnom obliku, a prijenos se odvija putem cisti sličnih amastigotima. Kod vrsta iz roda *Leishmania* razmnožavanje je u promastigotnom obliku u insekata koji sišu krv, kao npr. papatači, a ponovnim hranjenjem na domaćinu kralježnjaku s posljedičnom regurgitacijom sadržaja usnog aparata, i dospijećem u domaćina, budu podvrgnuti razmnožavanju, ali kao amastigoti u različitim tkivima.

Članovi roda *Trypanosoma* posjeduju najveću raznolikost oblika tijekom njihovog životnog ciklusa, mijenjajući se u dijeleće epimastigote u crijevu prijenosnika (insekta, pijavice), zatim u invazivne (metacikličke oblike) u prednjem ili stražnjem kraju crijeva, ovisno o vrsti *Trypanosoma* (ROBERTS i sur., 2004.).

Leishmania infantum

Lišmanioza je parazitarna bolest uzrokovana protozoima iz roda *Leishmania*, a prenosi se ciklički insektima iz rodova *Phlebotomus*, *Lutzomyia* i *Sergentomyia*. Pojedine vrste uzrokuju bolest kod pasa, mačaka, glodavaca i ljudi. U 32 zemlje svijeta javlja se lišmanioza uzrokovana sa različitim vrstama lišmanija, a endemska područja se šire iz godine u godinu. Smatra se da se pojavi 2 milijuna novih invazija u ljudi godišnje (500.000 kutana lišmanioza i 1.5 milijuna visceralna), dok je čak 12 milijuna već prisutno. Prisutno je i neinformiranje o novim invazijama s obzirom na to da se prijavi samo 600.000 slučajeva godišnje (WHO, 2007.). Protozoon *Leishmania infantum* dolazi na području Sredozemlja, Bliskog Istoka te u nekim dijelovima Azije i SAD-a. Sredozemno endemsko područje uključuje i sjevernoafričku obalu, te u Europi vrlo široku zonu od Iberijskog poluotoka preko južne Francuske, Italije, područja Balkana pa sve do Turske i Cipra (GRADONI i sur., 1984.). U obalnim područjima Sredozemnog mora seroprevalenca iznosi od 1 do 40%. Pri tome je jedan veći dio pasa inaparentno invadiran. Kod nas se seroprevalenca kreće između 1% i 42.85%, ovisno o lokaciji (ŽIVIČNJAK i sur., 2005.).

U domaćinu insektu, lišmanije parazitiraju ekstracelularno kao promastigotni oblici, dok u domaćinu kralješnjaku parazitiraju intracelularno, kao amastigotni oblici u stanicama mononuklearnog fagocitnog sustava, poput makrofaga, monocita, Langerhansovih stanica i dr. Amastigotni oblici koje nalazimo u sisavaca su okrugli ili jajoliki, veličine 1,5-5 x 1,2-2 μ m. U preparatima obojenim po Giemsi jasno se vidi jezgra, intenzivno obojen štapičasti kinetoplast i bič koji je smješten u bičevom džepu. Promastigotni oblici, koje nalazimo u vektorima ili u *in vitro* kulturama na temperaturi ispod 33°C, veličine su do 20 μ m. Vrste lišmanija, kao i mnogobrojni sojevi morfološki se ne razlikuju, a njihovo razlikovanje temelji se na biološkim, imunološkim, biokemijskim i molekularnim značajkama (SCHNIEDER, 2006.).

U području veterinarske medicine najznačajnija je lišmanioza u pasa, koja se u načelu javlja u visceralnom obliku, a u uznapredovalim slučajevima vrlo često se javljaju i kožne promjene. Inkubacija traje jedan do tri mjeseca, a često i do nekoliko godina (TALMI-FRANK i sur., 2006.). Dijagnoza se postavlja indirektno, na temelju nalaza seroloških testova (imunoenzimski test, indirektna imunofluorescencija), te direktno dokazom uzročnika *in vitro* uzgojem promastigotnih stadija. Za *in vitro* uzgoj najprikladniji je punktati limfnog čvora ili koštane srži.

U Europi se bolest javlja u endemskim područjima, gdje se protozoon *Leishmania infantum* prenosi ženka papatača, iz porodice *Phlebotomidae*, roda *Phlebotomus*, unutar populacije pasa ili drugih rezervoara, npr. lisice, rjeđe mačke i konji (ROLAO i sur., 2005.; SOLANO-GALLEGO i sur., 2002., RAMOS-VARA i sur., 1996.) i mačaka (MARTIN-SANCHEZ i sur., 2007., VITA i sur., 2005., RUFENACHT i sur., 2005., DE SOUZA i sur., 2005.). Papatači su vektori s izraženom aktivnošću za vrijeme sumraka i noći. Preko dana se skrivaju u vlažnim rupama glodavaca, šupljinama drveća, ali i u vlažnim nastambama te tamo sišu krv raspoloživih sisavaca (pas, ovca, konj, čovjek, ptica). Lišmanijama invadirane životinje, tj. psi, su glavni rezervoar parazita, osobito za vrijeme dugog razdoblja inkubacije (TALMI-FRANK i sur., 2006.; RODRIGUES-CORTES i sur., 2007.). Ženke flebotoma pri hranjenju uzimaju amastigotne oblike *Leishmania*, koji se nalaze u makrofagima ili monocitima kože invadiranog domaćina. U srednjem crijevu vektora, iz amastigotnih oblika razvijaju se promastigotni oblici, koji se intenzivno dijele binarnom diobom. Jedan dio se prihvaća za stijenku crijeva, dok ostali ostaju slobodni i odlaze u prednje dijelove probavnog sustava. Metaciklički promastigotni oblici kod daljnjeg hranjenja dospijevaju u kožu novog domaćina. Razvoj u vektoru pod optimalnim uvjetima može biti završen već za pet do osam dana. Invadirani papatači ubadaju češće nego neinvadirani, a invazijska doza za jednog kralješnjaka

procjenjuje se na 10 do 100 metacikličkih promastigota. Antigeni za serološke testove uglavnom se dobivaju iz kultura, koje ponekad mogu biti opasne pri manipulaciji (HERWALDT, 2001.). Liječenje visceralne lišmanioze nije jednostavno, osobito zbog načina primjene, ali i zbog nuspojava koje prate liječenje (HERWALDT, 1999.).

Radnici koji su nesretnim slučajem izloženi protozoonu *Leishmania sp.* trebaju se stalno pratiti. Osobito je važno iste podvrgnuti periodičnim serološkim testiranjima. Izolacija parazitskih hemoflagelata (kao izvora antigena) je ponekad otežana zbog kontaminacije primarnih kultura ne samo bakterijama, nego gljivicama i kvascima. Zbog navedenih razloga krenulo se u potragu za alternativnim izvorom antigena za serološke testove. Tako su MONTEON i sur. (1997.) koristili za čovjeka apatogene tripanosomatide za koje su dokazali postupkom western-blotinga vrlo visoku osjetljivost (100%) te specifičnost od svega 7% kod dijagnostike u Chagasove bolesti.

SEGHAL i sur. (1982.) su koristili za indirektnu imunofluorescenciju antigen protozoona *Crithidia luciliae* u dijagnostici visceralne lišmanioze ljudi. Autori ističu da ne postoji razlika. MARTINKOVIĆ i MARINCULIĆ (2006.) ispitali su unakrižnu reaktivnost istog bičaća dvjema metodama, indirektnom imunofluorescencijom i dot-immunoenzimskim testom, te govore o 100% unakrižnoj reaktivnosti između antigena promastigota *L. infantum* i hoanomastigota *C. luciliae*.

Trypanosoma rotatorium

Trypanosome (Euglenozoa, Kinetoplastida, Trypanosomatidae) su ekstracelularni, krvni paraziti koje možemo naći u svih kralješnjaka (HOARE, 1972.). Prenose ih hematofagni insekti i pijavice, koji služe kao domaćin i vektor tripanosoma. Hematofagni insekti i krpelji su pretežito vektori tripanosoma sisavaca i ptica, dok su pijavice vektori tripanosoma akvatičnih organizama (MARTIN i sur., 2002.). Smatra se da insekti mogu prenijeti tripanosome i u vodozemaca (BARDSLEY i HARMSSEN, 1973.). To se većinom odnosi na kopnene i arborealne žabe, dok su kod vodenih žaba, koje veći dio života provode u vodi, glavni vektori pijavice (BARDSLEY i HARMSSEN, 1973., DESSER i sur., 1973., 1975., FERREIRA i sur., 2008.).

Tripanosome vodozemaca su obično veće i složenije strukture od tripanosoma sisavaca. Filogenetski su grupirane zajedno sa ribljim tripanosomama u akvatičnu skupinu koja obuhvaća vrste tripanosoma koje dolaze u vodenih kralješaka, tj. u riba, kornjača, žaba (FERREIRA i sur., 2007.).

Prve žablje tripanosome otkrivene su 1842. u Europi, u krvi žaba *Rana esculenta*, te su nazvane *Trypanosoma rotatorium* (GRUBY, 1843.). Sve vrste tripanosoma opisivane su iz krvnih razmaza, na temelju morfoloških osobina i morfometrijskih parametara koji obuhvaćaju ukupnu duljinu tijela uključujući slobodni bič, opis undulirajuće membrane, oblik, širinu i duljinu jezgre, položaj kinetoplasta, te relativan odnos jezgre i kinetoplasta (MARTIN i sur., 2002.). Morfološka raznolikost (polimorfizam) tripanosoma opisuje postojanje dva ili više fenotipa unutar biološke vrste, što nam dokazuje velika raznolikost oblika tripanosoma nađenih u domaćina beskralješnjaka i kralješnjaka. Istraživanjima se uspostavilo da uz vrstu domaćina, samo jedan od mnogobrojnih čimbenika u okolišu ili životu domaćina može utjecati na morfološke osobine tripanosoma vodozemaca kao na primjer hormon rasta (BARDSLEY, 1972., GALLIARD i sur., 1953., 1954.).

Nažalost, takav opis je prilikom determinacije za većinu vrsta zbunjujući, i to zbog velike morfološke raznolikosti unutar jedinki iste vrste, te zbog činjenice da u istom domaćinu možemo istovremeno naći više vrsta tripanosoma, i to različitih stadija koji se morfološki razlikuju. Kao rezultat toga u pitanje se dovela vrijednost takve morfološke kategorizacije, te je objavljeno mnogo vrsta tripanosoma od kojih su mnoge svrstane u različite vrste, a zapravo pripadaju istoj (FERREIRA i sur. 2007.).

Zbog problema u klasifikaciji žabljih tripanosoma na temelju morfoloških osobina, znanstvenici su odlučili tripanosome žaba svrstati u *Trypanosoma rotatorium* kompleks (BARDSLEY i HARMSSEN, 1969.). *T. rotatorium* kompleks sastoji se od četiri oblika. Kod prvog oblika jedan kraj tijela tripanosome je tup, dok je drugi kraj šiljat i uzak. Bič i undulirajuća membrana su uočljivi. Kod drugog oblika uočljivo je okruglo i široko tijelo parazita, a slobodni bič nije uočljiv. Undulirajuća membrana vidljiva je samo na jednom kraju tijela. Oblik tijela kod trećeg oblika je uzak sa šiljatim krajevima, a širina tijela je gotovo jednaka na svim dijelovima. Jezgra je slabo vidljiva, dok su undulirajuća membrana i slobodni bič jasno vidljivi. Kod četvrtog oblika krajevi tijela su šiljati kao i kod trećeg oblika, ali širina prednjeg dijela tijela je znatno veća od stražnjeg dijela. Undulirajuća membrana i slobodni bič su dobro vidljivi, a jezgra je vrlo dobro izražena.

Prisutne su mnoge proturječnosti u literaturi o reprodukciji tripanosoma u domaćinu kralješnjaku, a one se temelje na činjenici da je svaki autor radio s različitim izolatima, te s različitim vrstama tripanosoma, premda nisu sa sigurnošću mogli tvrditi o kojoj je vrsti riječ. Kod *T. rotatorium* opisana je kombinacija mnogostruke i dvojne diobe, koja se javlja u različitim fazama životnog ciklusa u domaćinu kralješnjaku (FANTHAM i sur., 1942.). Reprodukcijski ciklus *T. rotatorium* u kralješnjaku odvija se koštanoj srži (TANABE, 1931.),

bubrezima (IVANIČ, 1936.), te povremeno i u perifernoj krvi (FANTHAM i sur., 1942.). Dvojna dioba javlja se tijekom početne faze infekcije, dok se mnogostruka dioba javlja kasnije, uslijed stalne infekcije u odraslih žaba (IVANIČ, 1936.).

Reprodukcija tripanosoma u beskralježnjaka, tj. u pijavica također obuhvaća dvojni i mnogostruku diobu, a odvija se u crijevu pijavica gdje se javlja raznolikost razvojnih oblika. U crijevu pijavice razvoj se odvija ciklički, tripomastigotni oblici naglo se dijele u epimastigotne oblike, koji se kasnije preobraze u metatripanosome (NÖLLER, 1913.). Razvijaju se samo pojedini tripomastigotni oblici iz krvi kralježnjaka, nakon što budu krvnim obrokom uneseni u tijelo pijavice, a ostali oblici degeneriraju neposredno nakon obroka (BUTTNER i BOURCART, 1955.).

Morfologija tripanosoma nađenih u punoglavaca razlikuje se od uobičajenih tipova pronađenih u odraslih žaba (NÖLLER, 1917.). Ova razlika se javlja zbog razlike okoliša u kojem živi punoglavac i odrasla žaba, a promjene koje nastaju tijekom metamorfoze domaćina budu u konačnici odgovorne za promjene morfologije jer nedavno metamorfozirane žabe imaju oblike tripanosoma karakteristične punoglavcima, dok ih odrasle nemaju (NÖLLER, 1917.).

T. rotatorium nije patogena u odraslih žaba, dok kod punoglavaca može izazvati uginuće (DOFLEIN, 1910.). Međutim, teške infekcije i superinfekcije su patogene i kod odraslih žaba, manifestiraju se odbijanjem hrane, letargijom te konačno smrću, s teškim promjenama u bubrezima (NÖLLER, 1917.). Tripanosome se mogu naći u perifernoj krvi žaba samo tijekom proljeća i ljeta. Kao uzroci sezonskih oscilacija, navodi se klima kao jedan uzrok ili točnije promjena temperature (BOLLINGER i sur., 1969.).

Proljeće je obično vrijeme vrha parazitemije (BARDSLEY, 1969., 1972., BOLLINGER i sur., 1969.) dok početkom jeseni parazitemija pada, iako su temperature i dalje visoke (BARDSLEY, 1969., 1972., BOLLINGER i sur., 1969.). Budući da okoliš na parazita djeluje isključivo preko krvi domaćina, pretpostavlja se da su promjene u krvi izravno odgovorne za varijacije u perifernoj parazitemiji.

Ubrizgavanje hiperglikemičnih agenata (glukagon i glukoza) u domaćina, uzrokuje povećanje parazitemije (BARDSLEY i HARMSSEN, 1970.), te zbog sezonske oscilacije glukoze u krvi i aktivnosti žlijezda koje ju kontroliraju (osobito nadbubrežna žlijezda), pretpostavlja se da su katekoalamini i glukoza vjerojatno odgovorni za sezonski ciklus bičaša, pogotovo jer drugi agensi, koji su sezonskog karaktera nisu imali učinak na povećanje parazitemije. Parazitemija također raste prilikom stresa (BARDSLEY i HARMSSEN, 1970.). Nema razlike u parazitemiji među spolovima (BARDSLEY, 1969., BOLLINGER i sur., 1969.).

Kada se krvni oblici tripanosoma nasade u jednu od standardnih hranjivih podloga, najčešći obrazac rasta i razvoja uključuje pojavu epimastigotnih, amastigotnih, tripomastigotnih i promastigotnih oblika. Pojavnost određenih oblika ovisi, osim o hranjivoj podlozi, isto tako i o drugim čimbenicima okoliša kao što je npr., temperatura (BUTTNER i BOURCART, 1955.).

OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Bičšaš *T. rotatorium* je parazit u krvi jestive zelene žabe (*Pelophylax esculentus*), nema patogenog učinka na domaćina i proširen je po cijelom svijetu. Dosadašnja istraživanja u svijetu temeljena na morfologiji iz krvi, pokazala su da je ova vrsta morfološki raznolika. S obzirom da za područje Republike Hrvatske ne postoje nikakvi službeni podaci o postojanju, niti o morfologiji ovih parazita, cilj je istu i opisati. Bijela krvna slika daje uvid u zdravstveno stanje jedinke, te bi isto tako mogla dati uvid u zdravstveno stanje pretraživanih uzoraka žaba sa visokom perifernom parazitacijom, komparirajući nalaze sa onima niske parazitacije ili negativnih na tripanosome. Isto tako, opisan je veliki broj hranjivih podloga za uzgoj bičšaša iz roda *Trypanosoma*, te je cilj istražiti brojnost i morfologiju dva izolata *T. rotatorium* u dvije različite *in vitro* hranjive podloge. U rutinskoj dijagnostici lišmanioze koriste se različite varijante antigena dobivenog iz bičšaša *Leishmania infantum*, uzročnika lišmanioze. Prema literaturnim podacima, protutijela koja nalazimo kod životinja oboljelih od lišmanioze, unakrižno reagiraju s antigenima drugih bičšaša iz porodice *Trypanosomatidae*. S obzirom da bičšaš *T. rotatorium* pripada istoj porodici kao i uzročnik lišmanioze, naša pretpostavka je da antigen *T. rotatorium* reagira sa protutijelima nastalim kod životinja invadiranih sa bičšašem *L. infantum*, te je cilj ispitati mogućnost unakrižnog reagiranja antigena *T. rotatorium* sa protutijelima protiv bičšaša *L. infantum*.

MATERIJAL I METODE

Morfologija, broj krvnih oblika T. rotatorium, bijela krvna slika

Za istraživanje je korišteno 18 arhivskih krvnih razmaza jestivih zelenih žaba (*P. esculentus*). Arhivski krvni razmazi su pripremljeni nanošenjem 10 µl krvi pojedinih jedinki zelenih žaba na predmetnice, osušeni na sobnoj temperaturi, fiksirani apsolutnim metanolom 5 minuta, osušeni, te pospremljeni u arhivu. Arhivski uzorci su obojeni metodom po Giemsi po standardnom protokolu (1ml Giemsa otopine i 9ml destilirane vode), te ostavljeni tako 30 i 60 minuta. Nakon bojanja razmazi su isprani destiliranom vodom i osušeni na sobnoj temperaturi. Obojeni preparati su potom pregledani na prisutnost bičaća ili nekih drugih parazita ili mikroorganizama inače prisutnih u krvi u slobodno živućih jedinki jestivih zelenih žaba. Svaki parazit je brojan te je konačni zbroj parazita pomnožen sa 100, a rezultat pojedinih uzoraka izražen kao broj tripanosoma u mililitru krvi. Svaki pojedini uzorak je pregledan u duplikatu i brojan dva puta. Neki od bičaća su slikani kamerom Artcam 300MI i mikroskopom Olympus Bx51, a slike su obrađene softverom QuickPHOTO MICRO 2.3. Crteži su nacrtani rukom.

Bijela krvna slika je izražena kao relativan odnos pojedinih bijelih krvnih stanica na ukupan broj stanica leukocita. Ukupno je pregledano 6 uzoraka krvnih razmaza i to tri uzorka sa velikim brojem parazita, dva sa malim brojem, te jedan negativan uzorak. Postupak je ponovljen 2 puta. Stanice su identificirane kao neutrofil, limfocit, eozinofil, bazofil i monocit (WOJTASZEK i ADAMOWICZ, 2003.). Fotografije su slikane i obrađene kao i krvni razmazi.

In vitro uzgoj, indirektna imunofluorescencija

Dva izolata *T. rotatorium* inokulirana su na dvije hranjive podloge: Liver Infusion Tryptose (LIT) hranjiva podlogu (ATLAS, 1997.) i Biphasic Chocolate Agar for Trypanosomatids (BCAT) hranjiva podlogu (MARTINKOVIĆ i sur., 2012.). Broj bičaća je praćen tijekom iduća dva tjedna, a morfologija u logaritamskoj i stacionarnoj fazi rasta. Postupak je ponovljen minimalno tri puta. Bičaći iz logaritamske i stacionarne faze bojani su po Giemsi, pregledani i slikani kao i krvni razmazi.

Pseći serumi sakupljeni su tijekom rutinskih pretraga na lišmaniozu, na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Korišteno je ukupno 50 arhivskih nasumično odabranih psećih uzoraka seruma, 16 pozitivnih i 34 negativna uzorka.

Antigen za pripremu indirektne imunofluorescencije napravljen je tako da su promastigoti protozoona *Leishmania infantum* MON-1 u logaritamskoj fazi rasta ispirani centrifugiranjem na 1500g, trokratno, u fosfatnom puferom pH 7.2 (phosphate-buffered-saline, PBS), te su potom resuspendirani u PBS-u do koncentracije od 10^7 promastigota/ml. Na svako polje predmetnice sa deset polja nakapano je 2,5 μ l te suspenzije. Promastigoti su zatim osušeni, fiksirani metanolom 5 minuta i isprani u PBS-u pet minuta. Zatim su osušeni i pohranjeni na +4°C do upotrebe ili su izloženi serumima razrijeđenim u PBS-u i inkubirani u vlažnoj komori, trideset minuta pri 37°C. Nakon što su serumi odstranjeni, predmetnice su trokratno isprane pet minuta u PBS-u, nakon čega su osušene. Nakon sušenja predmetnice su inkubirane trideset minuta pri 37°C, antipsećim protutijelima obilježenim fluoresceinom. Opet je ponovljeno trokratno ispiranje pet minuta u PBS-u i sušenje na sobnoj temperaturi. Rezultati testa očitani su fluorescentnim mikroskopom "Olympus Cx40". Epimastigoti protozoona *T. rotatorium* pripremljeni su na isti način kao i promastigoti protozoona *L. infantum* (MARTINKOVIĆ i sur., 2006.).

Statistički podaci obrađeni su softverom IBM SPSS for Windows 19 i Microsoft Office Excel 2003.

REZULTATI

Morfologija, broj krvnih oblika T. rotatorium, bijela krvna slika

Od ukupno osamnaest pregledanih uzoraka krvi žaba, jedan krvni razmaz je negativan dok su u ostalima nađene tripanosome, čineći tako prevalenciju od 94.44%. Broj parazita varirao je od 25 (\pm 50) do 4650 (\pm 420,3173) parazita/ml (Tablica 1). U krvnim razmazima nisu dokazani drugi krvni paraziti. U pozitivnim krvnim razmazima nađena su tri tipa tripanosoma koji morfološki odgovaraju *T. rotatorium* kompleksu. Kod prvog tipa uočljivo je veliko i ovalno tijelo parazita, koje na stražnjem kraju završava tupo, dok je prednji kraj blago zašiljen. Undulirajuća membrana vidljiva je samo na jednom kraju tijela, proteže se od prednjeg kraja do zadnje trećine duljine tijela, a smještena je na konveksnom rubu tijela. Slobodni bič kod ovog oblika nije uočljiv. Uočljiva je okrugla jezgra, koja je smještena na polovici duljine tijela, a pomaknuta je prema konveksnom rubu, onom na kojem je uočljiva undulirajuća membrana. Kinetoplast je malen i okrugao, smješten u zadnjoj trećini tijela. Citoplazma je negranulirana, a uzduž cijelog tijela parazita uočljivi su uzdužni grebeni ili brazde (Slika 3.1.a, b, slika 3.2.a, b). Drugi tip je nepravilnog oblika, sa dobro razvijenom undulirajućom membranom, kratkim slobodnim bičem, okruglog kinetoplasta i okrugle do ovalne jezgre. (Slika 3.1.e, f, slika 3.2.e, f). Duljina tijela trećeg tipa je manja u usporedbi sa prvim tipom. Tijelo je usko, polumjesečastog oblika, s nešto užim prednjim krajem, a oba kraja završavaju šiljato. Undulirajuća membrana jasno je vidljiva, proteže se cijelom duljinom tijela, duž konveksnog ruba. Slobodni bič dugačak je i dobro vidljiv, smješten je na prednjem kraju tijela, a dužine je do dvije trećine dužine tijela. Uočljiva je velika jezgra koja je izdužena, a smještena je u središnjem dijelu tijela, nešto bliže konveksnom rubu. Kinetoplast je smješten blizu stražnjeg kraja tijela, malen je i okrugao. Citoplazma nije granulirana (Slika 3.1.c, d, slika 3.2.c, d). Slika 4a prikazuje tripanosomu bojanu samo 30 minuta, gdje se vidi bič koji je slabo primio boju, a slika 4b istu tu tripanosomu bojanu još 30 minuta, gdje se bič vidi puno jasnije, te su stoga svi ostali preparati bojani 60 minuta.

Postotak bijelih krvnih stanica od ukupno šest pregledanih uzoraka je $74.8 \pm 4,91$ limfocita, $16 \pm 2,53$ neutrofila, $5.41 \pm 2,15$ eozinofila, $4,41 \pm 2,67$ bazofila i $4,25 \pm 1,95$ monocita (Tablica 2). Kod uzoraka sa niskim brojem parazita i negativnog uzorka postotak bijelih krvnih stanica je $76,33 \pm 4,08$ limfocita, $10,8 \pm 2,78$ neutrofila, $4,2 \pm 1,16$ eozinofila, $4,5 \pm 3,5$ bazofila i $4,2 \pm 2,13$ monocita. Najzastupljenije stanice u krvnim razmazima bili su limfociti. U krvnim razmazima limfociti su okruglog oblika, vidljiva je citoplazma tamne sivo-plave boje, dok je jezgra tamno ljubičasta. Jezgra je velika i ispunjava gotovo cijelu

stanicu, a citoplazma je vidljiva poput tankog prstena (Slika 5a). Monociti su također okrugle stanice, a njihova citoplazma je ružičaste boje, dok je jezgra tamno ljubičasta. Struktura kromatina nije tako gusta kao u limfocita. Jezgra je bubrežastog oblika, smještena na jednoj strani stanice (Slika 5b). Neutrofili su velike, okrugle stanice, razlikuju se od drugih stanica po svojoj segmentiranoj jezgri. Citoplazma se oboji svijetlo plavo, a jezgra svijetlo ljubičasto (Slika 5c). Eozinofili su okrugli, sadrže velike, sjajne, crvenkaste granule unutar citoplazme. Jezgra je segmentirana, obojena ljubičasto-crvenkasto (Slika 5d). Bazofili su male, okrugle stanice, koje u citoplazmi sadrže velike tamno ljubičaste granule. Jezgra se nejednako boji, te se sastoji od većih i manjih segmenata (Slika 5e).

***In vitro* uzgoj, indirektna imunofluorescencija**

U obje hranjive podloge tijekom logaritamske faze rasta, faze kad se paraziti dijele pojačano i ubrzo dostižu svoj maksimum populacije, uočljivi su mali i veliki epimastigotni oblici tripanosoma, odvojene jedinice, epimastigoti u početnoj fazi dvojne diobe te gotovo potpuno odvojene jedinice (Slika 6a, b, c, d, e, g). Jezgra u velikih epimastigotnih oblika je smještena u području prednje trećine tijela, a ovalni kinetoplast nalazi se ispred jezgre. U LIT-u su primijećeni jako veliki epimastigotni oblici (Slika 6h, i), koji svojim oblikom podsjećaju na krvne oblike tripanosoma, sa lijepo vidljivom udulirajućom membranom. Niti u jednoj hranjivoj podlozi nisu pronađeni tripomastigotni oblici. Prijelazni oblici iz epimastigotnih oblika u tripomastigotne su viđeni (Slika 6c, d), ali oni nikad ne završe svoj razvoj do tripomastigotnih oblika. U stacionarnoj fazi BCAT-a epimastigotni oblici zadržali su svoju tipičnu građu (Slika 6f), dok u LIT-u stanice počinju degenerirati, zaokruživati se u amastigotne ili amastigotima slične tvorbe (Slika 6j, k). Konačno, na kraju 14 dana, tripanosome u BCAT-u su bile vitalne, ali u manjem broju, dok su tripanosome u LIT- totalno degenerirale i uginule (Slika 6l). Niti u jednoj hranjivoj podlozi tijekom praćenja nisu primijećeni metaciklički tripomastigotni oblici. Krivulje rasta pojedinih izolata grafički su prikazane (Graf 1, Graf 2), gdje se može vidjeti da je izolat 1 pokazao bolji rast od izolata 2, te da je BCAT, s obzirom na preživljavanje bičaća bio bolji od LIT-a.

Pretraženo je ukupno 50 seruma pasa. Pozitivni uzorci su pokazali jasno citoplazmatsko ili membransko fluoresciranje zelene boje pri graničnom razrjeđenju 1/40 (Slika 7a, c), a negativni uzorci nisu pokazale specifično fluoresciranje zelene boje, već fluoresciranje crvene boje (Slika 7b, d). Rezultati ovog istraživanja prikazani su u Tablici 4. Iz tablice možemo zaključiti da je specifičnost antigena protozoona *T. rotatorium* 100%, tj. nije bilo lažnih pozitivnih rezultata, dok je osjetljivost nešto manja i iznosi 68,75%.

Tablica 1. Prikaz broja tripanosoma u mililitru krvi

Prikaz broja tripanosoma/ml krvi		
	srednja vrijednost	STDEV
uzorak 01	3950	±869,865890046659
uzorak 02	25	±50
uzorak 03	100	±115,470053837925
uzorak 04	900	±230,94010767585
uzorak 05	300	±244,948974278318
uzorak 06	250	±57,7350269189626
uzorak 07	3650	±212,132034355964
uzorak 08	1100	±81,6496580927726
uzorak 09	500	±115,470053837925
uzorak 10	50	±57,7350269189626
uzorak 11	2150	±238,047614284762
uzorak 12	1825	±386,221007541882
uzorak 13	4650	±420,317340430616
uzorak 14	825	±150
uzorak 15	475	±95,7427107756338
uzorak 16	0	0
uzorak 17	375	±95,7427107756338
uzorak 18	250	±57,7350269189626

Tablica 2. Ukupna bijela krvna slika

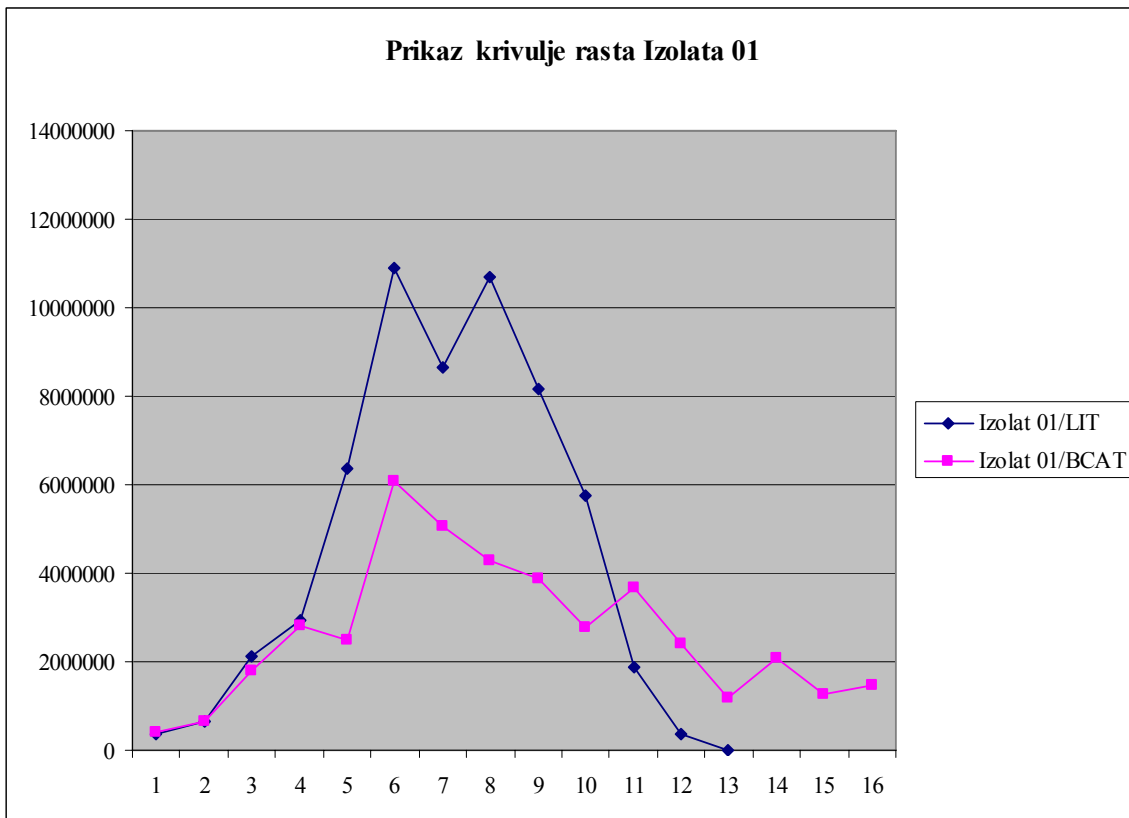
Ukupna bijela krvna slika		
	srednja vrijednost	STDEV
limfociti	74	±4,91750121319946
neutrofili	16	±2,53908835942543
eozinofili	5,416666667	±2,15146180044822
bazofili	4,416666667	±2,67847763183537
monociti	4,25	±1,95982373975546

Tablica 3. Komparativni prikaz bijele krvne slike u jedinki s visokom i niskom parazitemijom

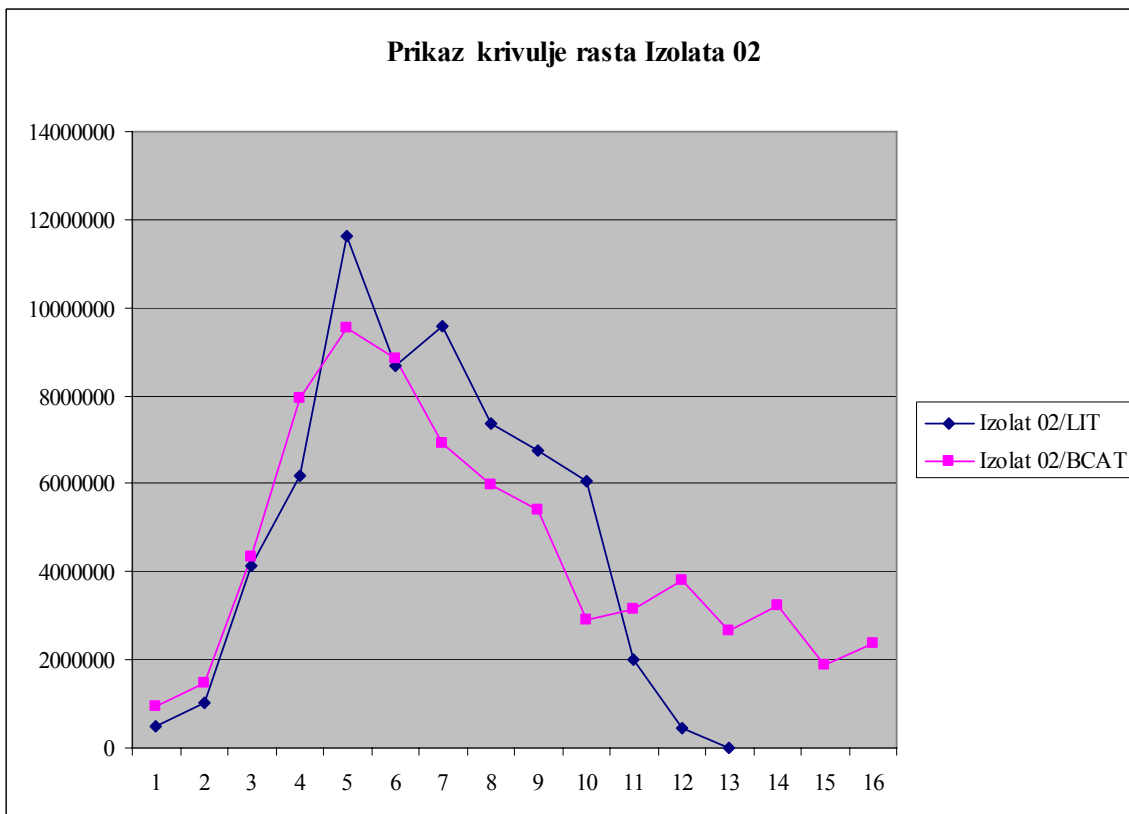
Komparativni prikaz bijele krvne slike u jedinki s visokom i niskom parazitemijom				
	visoka parazitemija		niska parazitemija	
	srednja vrijednost	STDEV	srednja vrijednost	STDEV
limfociti	71,66666667	±4,84424056655596	76,33333333	±4,08248290463869
neutrofil	13,0	±1,89736659610103	10,8	±2,78687399547713
eozinofili	6,7	±2,25092573548455	4,2	±1,16904519445001
bazofili	4,3	±1,86189867250253	4,5	±3,50713558335004
monociti	4,3	±1,96638416050035	4,2	±2,13697605664328

Tablica 4. Rezultati indirektne imunofluorescencije pretraživanih uzoraka seruma pasa

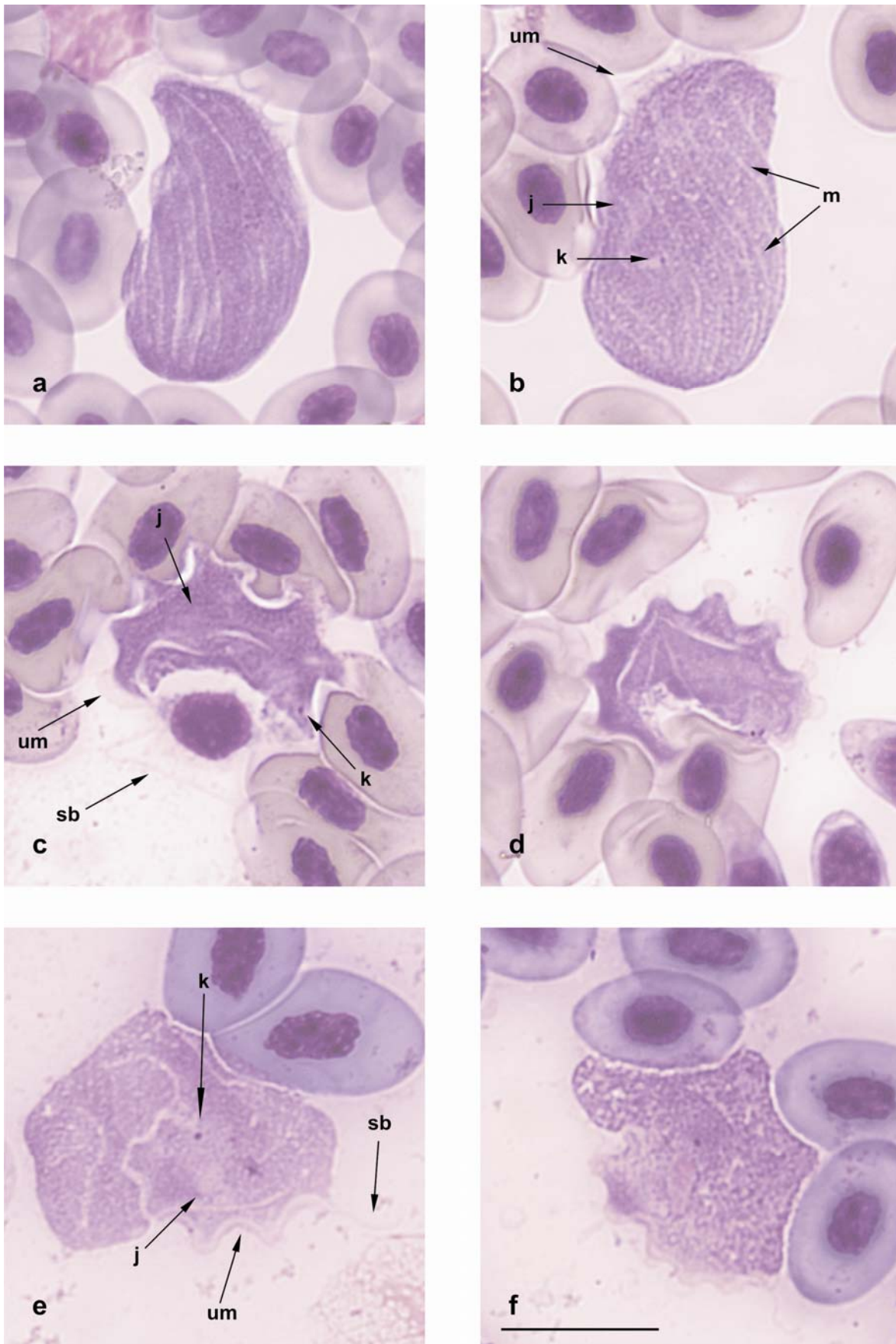
Rezultati indirektne imunofluorescencije pretraživanih uzoraka seruma pasa					
	pozitivno	negativno	ukupno	osjetljivost	specifičnost
antigen <i>Leishmania infantum</i>	16	34	50	100	100
antigen <i>Trypanosoma rotatorium</i>	11	39	50	68,75	100



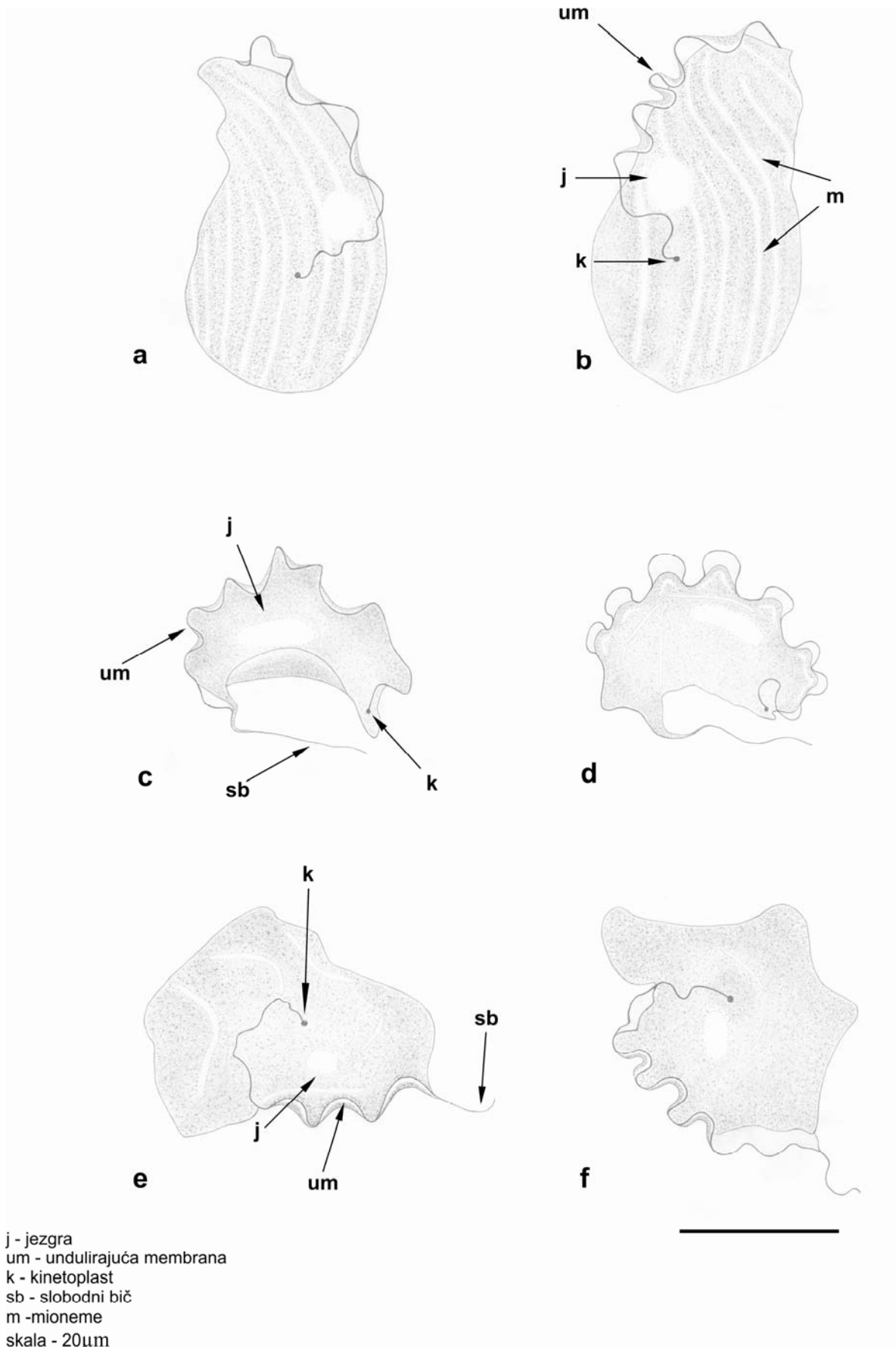
Graf 1. Komparativni prikaz krivulje rasta Izolata 01 u hranjivim podlogama LIT i BCAT



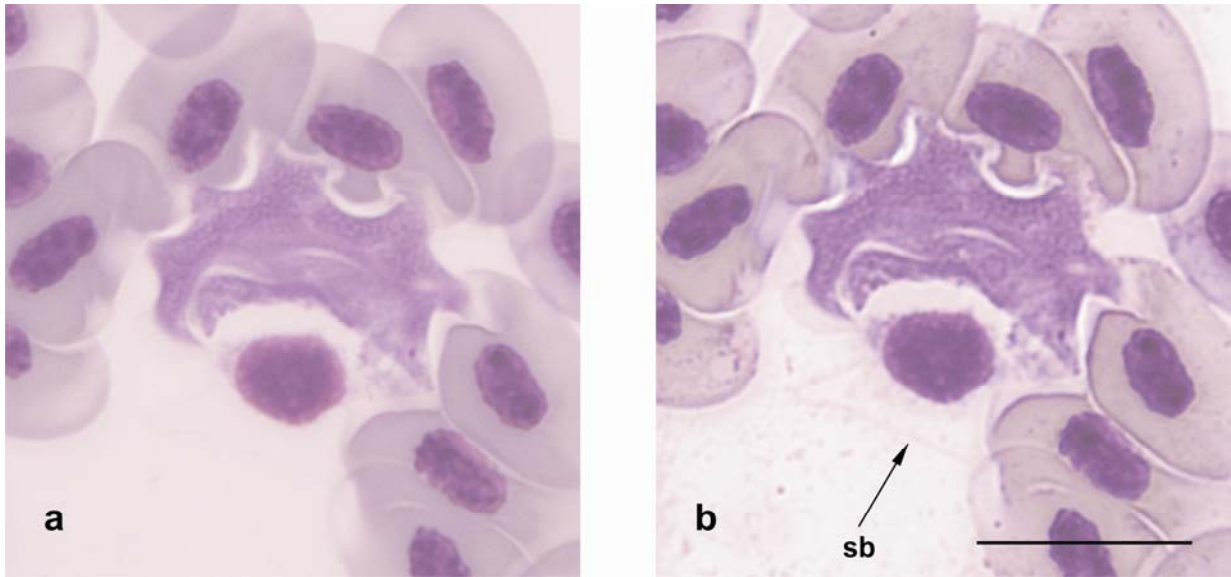
Graf 2. Komparativni prikaz krivulje rasta Izolata 02 u hranjivim podlogama LIT i BCAT



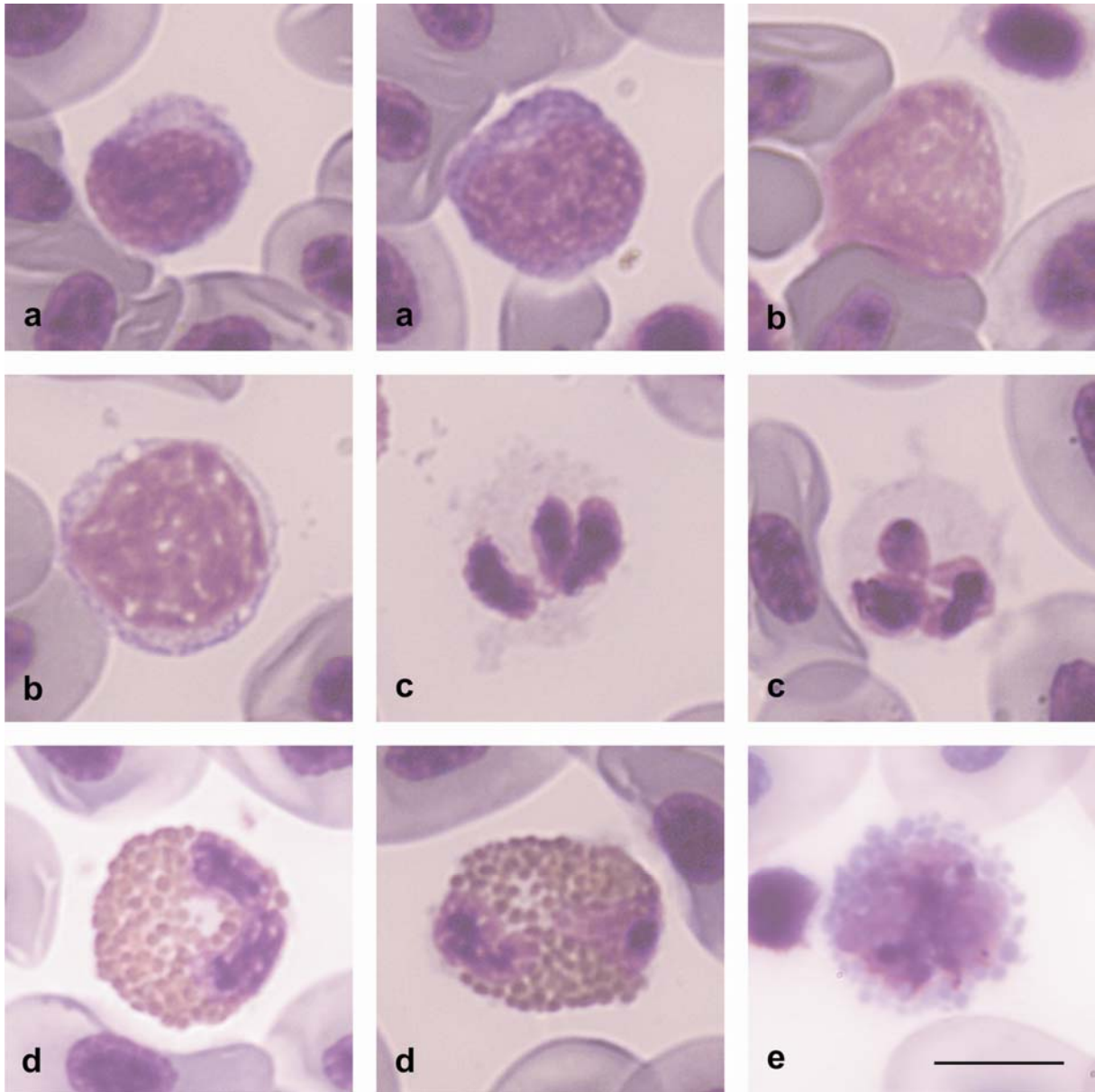
Slika 3.1. Prikaz morfološke raznolikosti tripanosoma pronađenih u krvnim razmazima (skala 20 μm).



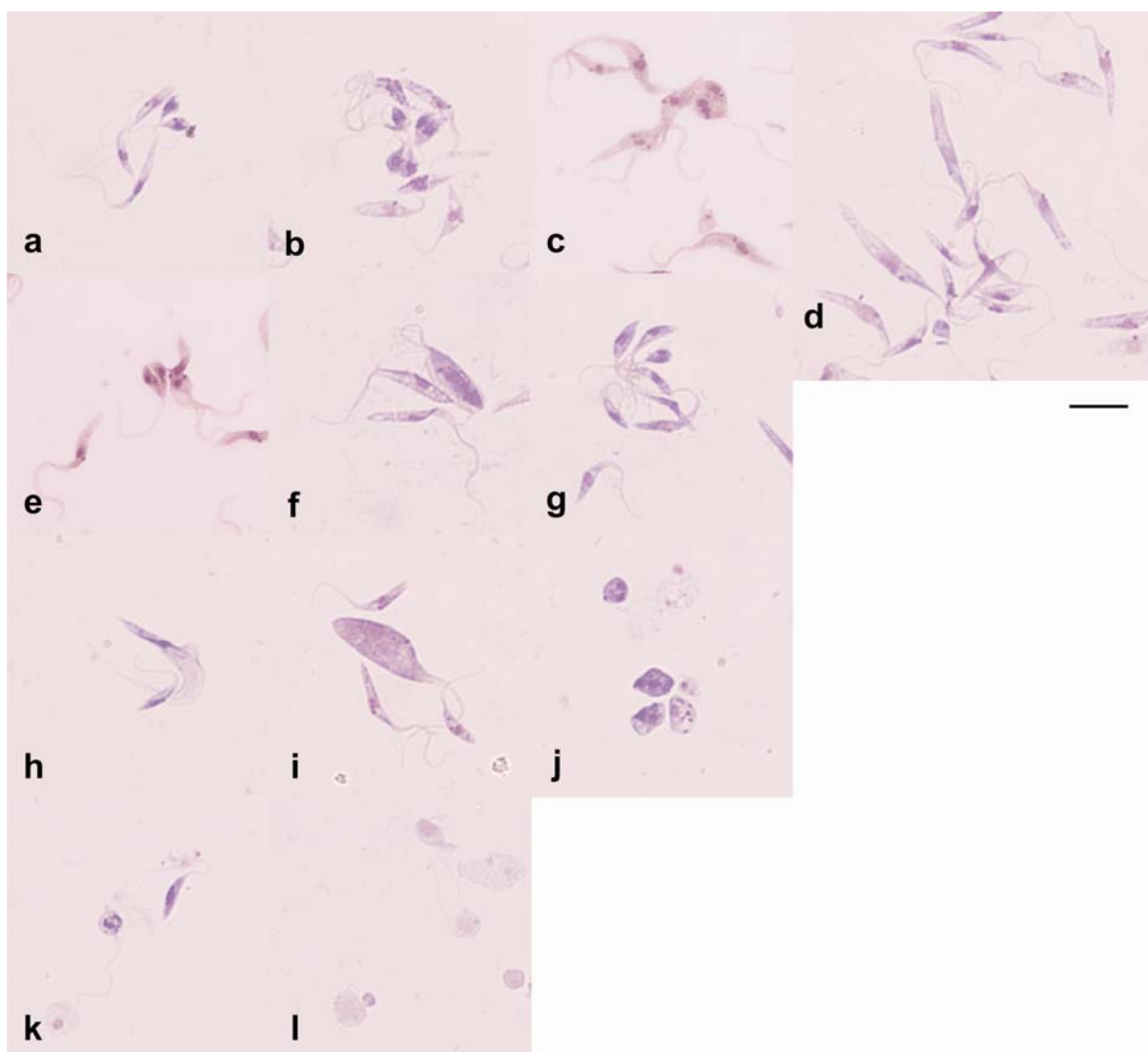
Slika 3.2. Shematski prikaz morfološke raznolikosti tripanosoma pronađenih u krvnim razmazima (skala 20 μ m).



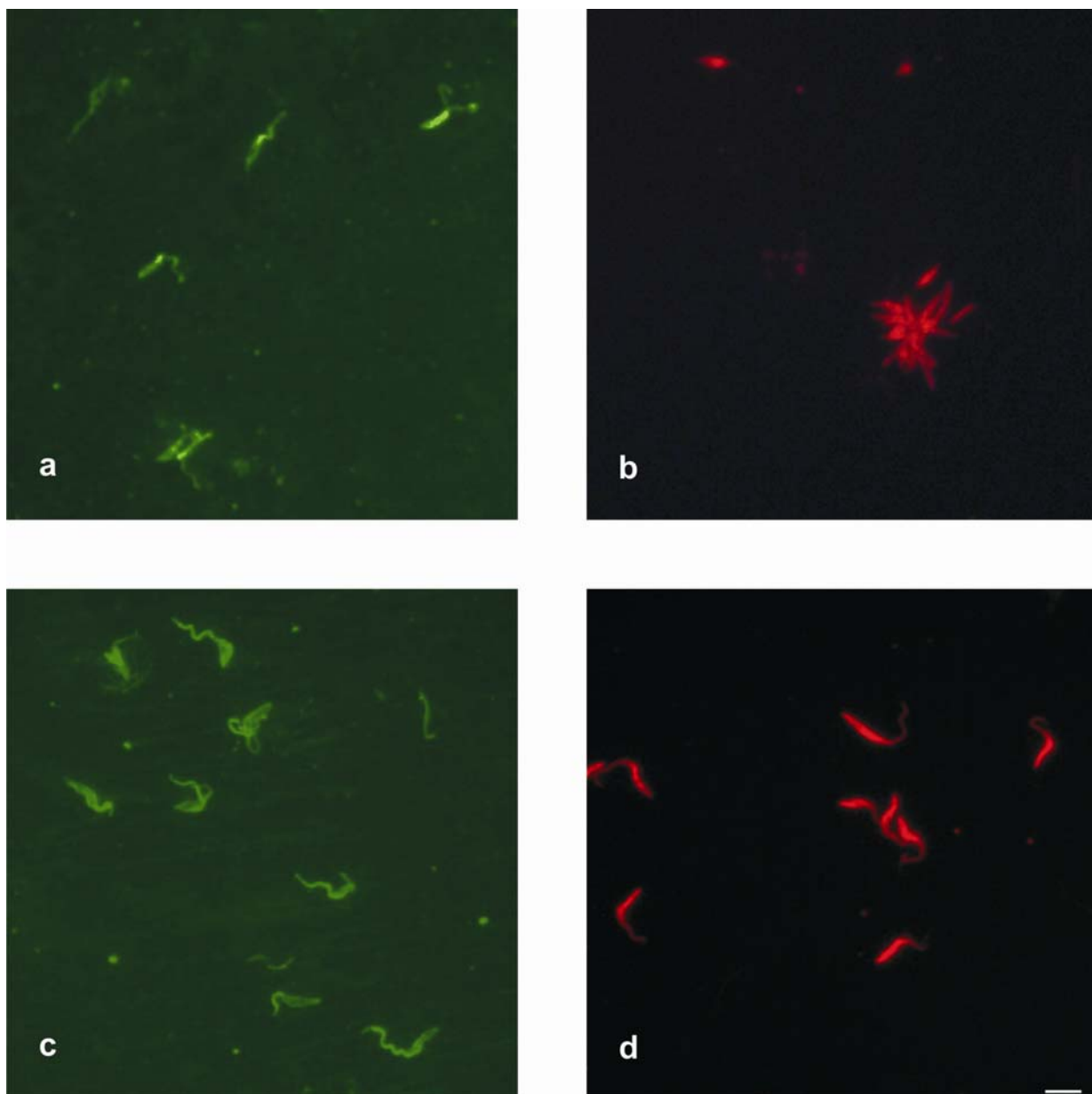
Slika 4. Komparativni prikaz različite duljine trajanja bojanja po Giemsi. Preparat bojan 30 minuta prikazuje nejasan slobodni bič (a), a dodatnim bojanjem od još 30 minuta (ukupno 60 minuta) taj se bič jasno vidi (b). Skala 20 μ m.



Slika 5. Prikaz pojedinih vrsta leukocita: limfocit (a), monocit (b), neutrofil (c), eozinofil (d), bazofil (e). Skala 10 μ m.



Slika 6. Prikaz tripanosoma uzgajanih u BCAT hranjivoj podlozi (a-f) i LIT hranjivoj podlozi (g-l). Skala 10 μ m.



Slika 7. Prikaz rezultata indirektne imunofluorescencije s antigenom promastigota, bičaća *L. infantum* (a – pozitivan, b - negativan) i antigenom epimastigota *T. rotatorium* (c –pozitivan, d – negativan). Skala 10 μ m.

RASPRAVA

U ovom istraživanju u gotovo svih uzoraka pronađene su tripanosome što govori o vrlo visokoj prevalenciji (94,44%). Pronađena su tri od četiri literaturno poznata tipa. Morfologija opisanih u istraživanju se podudara sa već opisanim (NÖLLER, 1917.; ŽIČKUS, 2002.). Ovdje je po prvi puta opisan protozoon *T. rotatorium* u jestive zelene žabe (*P. esculentus*) na području Republike Hrvatske.

Učinkovit odnos između domaćina/parazita/prijenosnika ovisi o sinkronizaciji između vrhunca periferne parazitemije domaćina i hranjenja hematofagnih vektora (BARDSLEY i HARMSSEN, 1969.). Prijenos tripanosoma sa domaćina na vektora odvija se u odraslih žaba, pa je važno objasniti kada je količina tripanosoma u perifernoj krvi žaba najveća. Temperatura je najveći faktor koji utječe na perifernu parazitemiju (BARDSLEY i HARMSSEN, 1969.). Visoke temperature (27 °C) su uvijek povezane sa visokom perifernom parazitemijom svih oblika tripanosoma, dok je pri niskim temperaturama (10 °C) periferna parazitemija uvijek niska. Povećana metabolička aktivnost žaba, koja raste sa povišenjem temperature, najviše je odgovorna za otpuštanje tripanosoma iz organa u perifernu cirkulaciju (BARDSLEY i HARMSSEN, 1969.). U proljetnim mjesecima, pri vanjskoj temperaturi od 26 °C periferna parazitemija je najveća, a to je i vrijeme najveće aktivnosti hematofagnih insekata što nam ukazuje na prijenos tripanosoma hematofagnim insektima i u vodenih žaba (BARDSLEY i HARMSSEN 1969.; DESSER, 1973., 1975.). U ovom istraživanju zatekli smo različitu parazitemiju, što nam govori da su osim vanjskih utjecaja (poput temperature, dužine dana, stresa), jedinke bile u različitim fazama razvoja invazije.

Određivanje parametara poput bijele krvne slike su važni zato što nam daju uvid u zdravstveno stanje jedinke. Povećana količina neutrofila ukazuje nam na infekciju, dok je povećana količina eozinofila vezana za parazitaru invaziju. Do povećanja neutrofila i limfocita također dolazi prilikom stresa (DAVIS i DURSO, 2009.). U istraživanju su uočljive male, zanemarive razlike u postotku limfocita, neutrofila i bazofila između pozitivnih jedinki i jedinki s malom parazitemijom, no to je bilo u granicama normale (DAVIS i DURSO, 2009.). Broj leukocita u krvi žaba također ovisi i o vrsti, godišnjem dobu, spolu, te o samoj kondiciji žabe (WOJTASZEK i ADAMOWICZ, 2003.). Kod žaba u kojih su utvrđeni krvni paraziti roda *Hepatozoon* utvrđene su razlike u bijeloj krvnoj slici u žabe *R. pipiens*, no autori ne mogu povezati da li je to zbog samih parazita ili zbog vanjskih čimbenika (SHUTLER i MARCOGLIESE, 2011.). U žaba koje su imale tripanosome, FANTHAM i sur. (1942.) nisu

pronašli značajne razlike u bijeloj krvnoj slici. U ovom istraživanju je pregledan mali broj uzoraka, te se ne može zaključiti da su tripanosome imale utjecaja na bijelu krvnu sliku. Isto tako sve te jedinice imale su simbioante i parazite u probavnom sustavu (MARTINKOVIĆ, osobno priopćenje), te bi ti stanovnici isto tako mogli utjecati na bijelu krvnu sliku.

Da se utvrdi stvarni utjecaj *T. rotatorium* na bijelu krvnu sliku jestive zelene žabe, bilo bi potrebno posjedovati laboratorijski uzgojene jedinice (bez ikakvih patogena), eksperimentalno ih invadirati sa kulturama ili krvnim oblicima *T. rotatorium*, te onda istražiti utjecaj *T. rotatorium* na bijelu krvnu sliku.

U *in vitro* hranjivim podlogama zamijećeni su mali i veliki epimastigotni oblici, oblici koji podsjećaju na krvne oblike po svojem obliku, te amastigoti ili amastigotima slični oblici. Nisu zamijećeni promastigotni oblici (NÖLLER, 1917.), tripomastigotni oblici ili metaciklički tripomastigotni oblici. Morfologija i broj tripanosoma ovisi o hranjivoj podlozi i o temperaturi, što je i rezultiralo određenim brojem i oblicima u testiranim hranjivih podloga ovog istraživanja. U BCAT- u su paraziti dosegli manji broj, duže su živjeli i bilo je moguć ostvariti kontinuirani uzgoj, za razliku od LIT-a gdje je ostvaren veći broj parazita, kraći životni vijek, te nemogućnost umnažanja u kontinuiranom uzgoju. LIT je skupa hranjiva podloga, bogata hranjivim tvarima, no na neki način tripanosome budu oštećene tako da više nisu sposobne rasti u idućoj pasaži. Unatoč tome LIT hranjiva podloga bi se mogla iskoristiti za brzo i jednokratno umnažanje tripanosoma. BCAT je relativno jeftina hranjiva podloga, zabilježen je manji broj tripanosoma u njoj, ali ne oštećuje parazite, tako da su se oni sposobni umnažati u serijskim pasažama, te je s time izvrsna kao hranjiva podloga za kontinuirani uzgoj istih.

Prilikom pripreme antigena za serološke pretrage za dijagnostiku lišmanioze u laboratoriju, osoblje se može invadirati kontaktom sa uzgojenim parazitom ili primjercima iz invadiranih osoba ili životinja (HERWALDT, 2001.). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na mogućnost korištenja epimastigota *T. rotatorium* kao alternativnog izvora antigena za serološku dijagnostiku lišmanioze pasa. Specifičnost antigena *T. rotatorium* bila je 100%, tj. nije bilo lažnih pozitivnih rezultata, a osjetljivost je bila nešto niža (68.5%). Prema arhivskim podacima, svi uzorci, koji su dali lažni negativni rezultat bili su niskog titra protutijela. Svi ti uzorci s niskim titrom protutijela potjecali su od životinja koje su bile ili na dugotrajnoj terapiji (više od pola godina) ili nisu pokazivale nikakve kliničke simptome. Svi pozitivni uzorci sa antigenom *T. rotatorium*, prema arhivskim podacima, bili su visokog titra protutijela, te su potjecali od životinja sa kliničkom slikom lišmanioze ili od životinja koje su bile na terapiji nekoliko mjeseci.

Dakle, zbog svoje apatogenosti za ljude, otprilike iste jednostavnosti u kultiviranju kao i *L. infantum*, *T. rotatorium* može poslužiti kao alternativan izvor antigena za serološku dijagnostiku kliničkog oblika lišmanioze pasa.

ZAKLJUČCI

- Po prvi puta je opisan protozoon *T. rotatorium* u jestive zelene žabe (*P. esculentus*) na području Republike Hrvatske.
- Prevalencija tripanosoma u pretraženih uzoraka je iznosila 94.4%.
- Bijela krvna slika bila je u granicama normale.
- Od dvije hranjive podloge testirane u ovom istraživanju, BCAT se pokazao boljim.
- Antigen *T. rotatorium* je pokazao unakrižnu reaktivnost s protutijelima protiv protozoona *L. infantum*, te bi mogao poslužiti kao alternativni izvor antigena u rutinskoj dijagnostici kliničkog oblika lišmanioze pasa.

LITERATURA

- ATLAS, R.M. (1997): Handbook of Microbiological Media, 3rd ed., CRC-Press. Boca Raton, New York, London, Tokyo. p. 764.
- BARDSLEY, J. E., R. HARMSSEN (1969): The trypanosomes of Ranidae. I. The effects of temperature and diurnal periodicity on the peripheral parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). Can. J. Zool. 47, 283-288.
- BARDSLEY, J. E. R. HARMSSEN (1970): The trypanosomes of Ranidae. II. The effects of excitation and adrenalin on the peripheral parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). Can. J. Zool. 48, 1317-1319.
- BARDSLEY, J. E., R. HARMSSEN (1973): The trypanosomes of Anura. Adv. Parasitol. 11, 1-73.
- BOLLINGER, R. R., J. R. SEED, A.A. GAM (1969): Studies on frog trypanosomiasis. II. Seasonal variations in the parasitemia levels of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Louisiana. Tulane Stud. Bot. Zool. 15.
- BUTTNER, A., N. BOURCART (1955): Sur certaines particularités biologiques d'un trypanosome de la grenouille verte, *Trypanosoma inopinatum* Sergent, 1904. Anns. Parasit. 30, 431-445.
- DAVIS, A. K., DURSO A. M. 2009. White blood cell differentials of Northern Cricket frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. Herpetologica 65, 260-267.
- DESSER S.S., S.B. MCIVER, D. JEZ (1975): Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. Int. J. Parasitol. 5, 507-509.
- DESSER S.S., S.B. MCIVER, A. RYCKMAN (1973): *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. J. Parasitol. 2, 353-358.
- DOFLEIN, F. (1910): Studien zur Naturgeschichte der Protozoen VI. Experimentelle Studien über die Trypanosomen des Frosches. Arch. Protistenk. 19, 207-231.
- FANTHAM, H. B., A. PORTER, L.R. RICHARDSON (1942): Some haematozoa observed in vertebrates in eastern Canada. Parasitology 34, 199-226.
- FERREIRA, R.C., M. CAMPANER, L.B. VIOLA, C.S. TAKATA, G.F. TAKEDA, M.M.G. TEIXEIRA (2007): Morphological and molecular diversity and phylogenetic

- relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology* 134, 1623-1638.
- FERREIRA, R. C., A.A. DE SOUZA, R.A. FREITAS, M. CAMPANER, C.S.A. TAKATA, T.V BARRETT, J.J. SHAW, M.M.G. TEIXEIRAe (2008): A Phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 427-435.
- GRADONI L., M. GRAMICCIA, E. POZIO (1984): Status of the taxonomy of *Leishmania* from the Mediterranean basin. *Parassitologia* 26, 289-297.
- HERWALDT B. L. (1999): Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- HERWALDT B. L. (2001): Laboratory-acquired parasite infections from accidental exposures. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 659-688.
- HOARE C.A. (1972): Trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publ., Oxford.
- IVANIČ, M. (1936): Structure du noyau au repos et sa division au dkbut de la division multiple (schizogonie) chez le *Trypanosoma rotatorium* Mayer. *Cellule* 44, 349-366.
- MARTINKOVIĆ F., A. MARINCULIĆ (2006): Antibodies against *Leishmania* cross-react with *Crithidia luciliae*: indirect immunofluorescence and Dot-ELISA study in dogs. *Parasitol. Res.* 98, 378-380.
- MARTINKOVIĆ F., K. MATANOVIĆ, A.C. RODRIGUES, H.A. GARCIA, M.M.TEIXEIRA (2012): *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in the Sheep Ked *Melophagus ovinus* from Organic Farms in Croatia: Phylogenetic Inferences Support Restriction to Sheep and Sheep Keds and Close Relationship with Trypanosomes from Other Ruminant Species. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 134-144.
- MARTIN, D. S., A.D.G. WRIGHT, J.R. BARTA, S.S. DESSER, (2002): Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRna gene sequences. *J. Parasitol.* 88, 566-571.
- MARTIN-SANCHEZ J., C. ACEDO, M. MUNOZ-PEREZ, B. PESSON, O. MARCHAL, F. Morillas-Marquez (2007): Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain., *Vet. Parasitol.* 145, 267-273.
- MONTEON V. M., L. GUZMAN-ROJAS, C. NEGRETE-GARCIA, J. L. ROSALES-ENCINA, P. A. R. LOPEZ (1997): Serodiagnosis of American trypanosomosis by using nonpathogenic trypanosomatid antigen. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3316-3319.

- NÖLLER, W. (1913): Die Blutprotisten des Wasserfrosches un ihre Übertragung. Arch. Protistenkd. 28, 313-316 (Vorläufige Mitteilung).
- NÖLLER, W. (1917): Die Blutprotisten des Wasserfrosches un ihre Übertragung. Arch. Protistenkd. 31, 169-240.
- RAMOS-VARA J. A., B. ORTIZ-SANTIAGO, J. SEGALES, R. W. DUNSTAN (1996): Cutaneous leishmaniasis in two horses. Vet. Pathol. 33, 731-734.
- ROBERTS L., J. JANOVY, P. SCHMIDT (2004): Foundations of Parasitology, 7th ed., McGraw-Hill Higher Education, pp. 61-88.
- RODRIGUEZ-CORTES A., A. OJEDA, L. LOPEZ-FUERTES, M. TIMON, L. ALTET, L. SOLANO-GALLEGO, E. SANCHEZ-ROBERT, O. FRANCINO, J. ALBEROLA (2007): A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. Int. J. Parasitol. 37, 683-693.
- ROLAO N., M. J. MARTINS, A. JOAO, L. CAMPINO (2005): Equine infection with *Leishmania* in Portugal. Parasite. 12, 183-186.
- RUFENACHT S., H. SAGER, N. MÜLLER, V. SCHAEERER, A. HEIER, M. M. WELLE, P. J. ROOSJE (2005): Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. Vet. Rec. 23, 542-545.
- SCHNIEDER T. (2006): Veterinärmedizinische Parasitologie. 6th ed., Parey, pp. 412- 415.
- SEGHAL S., B. K. AIKAT, A. G. S. PATHANIA (1982): Immune complexes in Indian kala-azar. Bull. WHO 60, 945-949.
- SHUTLER D., D.J. MARCOGLIESE (2011): Leukocyte Profiles of Northern Leopard Frogs, *Lithobates pipiens*, Exposed to Pesticides and Hematozoa in Agricultural Wetlands. Copeia 2011, 301-307.
- SOLANO-GALLEGO L., H. FERNANDEZ-BELLON, R., SERRA M. GALLEGGO, A. RAMIS, D. FONDEVILA, L. FERRER (2003): Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. Equine Vet. J. 35, 320-323.
- TALMI-FRANK D., D. STRAUSS-AYALI, C. L. JAFFE, G. BANETH (2006): Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. Clin. Vaccine Immunol. 13, 271-276.
- TANABE, M. (1931): Studies on the blood inhabiting Protozoa of the frog. Keijo J. Med. Japan 2, 53-71.

- VITA S., D. SANTORI, I. AGUZZI, E. PETROTTA, A. LUCIANI (2005): Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet. Res. Commun.* 29 Suppl. 2, 319-321.
- WHO, 2007, <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>
- WOJTASZEK, J., A. ADAMOWICZ (2003): Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. *Comp. Clin. Path.* 12, 129-134.
- ŽIČKUS, T. (2002): The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Zool. Lit.* 12, 197-202.
- 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.

SAŽETAK

Irena Reil
studentica 6. godine

MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA BIČAŠA *Trypanosoma rotatorium* TE NJEGOVA UNAKRIŽNA REAKTIVNOST S PROTUTIJELIMA PROTIV BIČAŠA *Leishmania infantum*

Bičuš *Trypanosoma rotatorium* je parazit u krvi jestive zelene žabe (*Pelophylax esculentus*), proširen je po cijelom svijetu i nema patogenog učinka na domaćina. Bijela krvna slika daje uvid u zdravstveno stanje jedinke. U ovom istraživanju je pretraženo ukupno 18 krvnih razmaza jestivih zelenih žaba. Po prvi puta je opisana morfologija krvnih oblika *T. rotatorium* u *P. esculentus* na području Republike Hrvatske, te bijela krvna slika istih. Također je opisano ponašanje dva izolata *T. rotatorium* u dvije *in vitro* hranjive podloge.

U rutinskoj dijagnostici lišmanioze koriste se različite varijante antigena dobivenog iz bičuš *Leishmania infantum*, uzročnika lišmanioze, koji mogu biti infektivni za laboratorijske radnike. S obzirom da bičuš *T. rotatorium* pripada istoj porodici kao i uzročnik lišmanioze, testirani su uzorci seruma pasa s antigenom *T. rotatorium*.

Ključne riječi: *Trypanosoma rotatorium*, morfologija, *in vitro* uzgoj, bijela krvna slika, *Leishmania infantum*, unakrižna reaktivnost

SUMMARY

Irena Reil

6 th year student

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF FLAGELLATE *Trypanosoma rotatorium* AND ITS CROSSREACTIVITY WITH ANTIBODIES AGAINST FLAGELLATE *Leishmania infantum*

Flagellate *Trypanosoma rotatorium* is a blood parasite of the green frog (*Pelophylax esculentus*), distributed throughout the world and apathogenic for its host. White blood cell count is a marker of current health state. In this research 18 blood samples from the green frog were examined. For the first time morphology of the blood forms *T. rotatorium* in *P. esculentus* in Croatia was described and white blood cell count was done. Also, behaviour of two isolates *T. rotatorium* in two *in vitro* culture media was described.

In routine diagnostics of leishmaniasis different types of antigens obtained from flagellate *Leishmania infantum*, the causative agent of leishmaniasis, were used. They can be infective for laboratory workers. Since *T. rotatorium* flagellate belong to the same family as the causative agent of leishmaniasis, dog sera samples with *T. rotatorium* antigen were tested.

Keywords: *Trypanosoma rotatorium*, morphology, *in vitro* cultivation, white blood cells count, *Leishmania infantum*, cross-reactivity

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28.04.1988. u Zagrebu. Osnovnu školu " Dr. Ivan Merz" pohađala sam u Zagrebu, te sam ju završila sa odličnim uspjehom. Nakon završene osnovne škole, upisala sam Gornjogradsku gimnaziju u Zagrebu. Godine 2006., maturirala sam sa odličnim uspjehom te sam upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija volontirala sam u studentskoj grupi EGZO-VET koja se bavi egzotičnim životinjama, a 2010. godine sudjelovala sam kao demonstrator na tečaju za veterinare, pod nazivom "Stručno usavršavanje veterinaru ovlaštenih za obilježavanje i evidenciju zaštićenih i strogo zaštićenih životinja u zatočeništvu".