

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Maja Antolić, studentica VI godine

Željka Anzulović, studentica VI godine

**MOLEKULARNA ETIOLOŠKA
RETROSPEKTIVNA STUDIJA INFEKCIOSNIH
HEMOLITIČKIH ANEMIJA PASA**

Studentski rad

Zagreb, 2013.

Ovaj rad je izrađen u suradnji Zavoda za patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Laboratorija za parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta pod vodstvom doc. dr. sc. Ane Beck i dr. sc. Relje Becka te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012./2013..

POPIS KRATICA

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EMH - ekstramedularna hematopoeza

EVH - ekstravaskularna hemoliza

HP – broj histopatološkog protokola

IMHA – imunosna hemolitička anemija

MAT – mikroskopska aglutinacija

PCR –lančana reakcija polimerazom (polymerase chain reaction)

pb – parovi baza

RNK – ribonukleinska kiselina

SADRŽAJ

UVOD	1
HIPOTEZA	4
MATERIJALI I METODE	5
1. Supstrat istraživanja.....	5
2. Arhiva obdukcijских nalaza	5
3. Arhiva histopatoloških uzoraka	6
4. Kriteriji uzorkovanja tkiva za DNK izolaciju.....	7
5. Dobivanje tkivnih isječaka	7
6. Deparafinizacija.....	8
7. Izdvajanje DNK.....	8
8. Lančana reakcija polimerazom	8
A) <i>Babesia sp.</i>	9
B) <i>Hepatozoon canis</i>	9
C) <i>Anaplasma phagocytophilum, Anaplasma platys i Ehrlichia canis</i>	10
D) <i>Leptospira interrogans</i>	10
E) <i>Bartonella sp.</i>	10
REZULTATI	12
1. Patoanatomski nalazi	14
2. Histopatološki nalazi	18
A) <i>Histopatološki rezultati slijepa mikroskopske analize slezene</i>	18
B) <i>Histopatološki rezultati slijepa mikroskopske analize bubrega</i>	19
C) <i>Histopatološki rezultati slijepa mikroskopske analize jetre</i>	19
D) <i>Histopatološki rezultati slijepa mikroskopske analize pluća</i>	20
E) <i>Histopatološki rezultati slijepa mikroskopske analize srca</i>	21
RASPRAVA	23
ZAKLJUČAK	26

POPIS LITERATURE.....	27
SAŽETAK.....	30
SUMMARY.....	31

UVOD

Anemija predstavlja gubitak, odnosno smanjenu količinu crvenih krvnih stanica i/ili hemoglobina. Tri su osnovna uzroka anemija, a to su prekomjeren gubitak krvi, hemoliza odnosno prekomjerno uništavanje crvenih krvnih stanica i nedovoljna proizvodnja crvenih krvnih stanica (eritropoeza). Hemolitičke anemije nastaju kada udio destrukcije nadjača produkciju eritrocita, a mogu biti nasljedne ili stečene. Prema mjestu destrukcije eritrocita dijelimo ih na intravaskularne i ekstravaskularne. Ekstravaskularna hemoliza odvija se u stanicama monocitno-makrofagnog sustava slezene, koštane srži, jetre, i limfnih čvorova i rezultira pojačanom sintezom nekonjugiranog bilirubina u krvnoj plazmi te konjugiranog bilirubina u jetri i nastanka bilirubinemije i bilirubinurije. Prebojavanje svih organa i tkiva bilirubinom naziva se ikterus. Intravaskularnu hemolizu odlikuje obilno otpuštanje hemoglobina u plazmu što uzrokuje hemoglobinemiju, a posljedično tome i hemoglobinuriju. Oštećenja organa i tkiva u hemolitičkim anemijama bez obzira na uzrok hemolize, nastaju zbog hipoksičnog oštećenja svih organa i tkiva te toksičnog djelovanja bilirubina i hemoglobina, prvenstveno na tubularni epitel bubrega (VALLI i sur., 2007.). Od stečenih anemija pasa najčešća je hemolitička anemija izazvana djelovanjem autoprotutijela na eritrocite (60-75%) i naziva se imunosna hemolitička anemija (IMHA). Ona se može javiti kao primarna bolest ili kao sekundarna reakcija na novotvorine, infekcije, lijekove i vakcine. Infekcijske hemolitičke anemije nastaju zbog umnažanjem patogena u eritrocitima ili zbog djelovanja njihovih endogenih i egzogenih toksina na membrane crvenih krvnih stanica te zbog autoprotutijela na eritrocitne proteine nastalih uslijed upalnog odgovora. Hemolitičke anemije infektivnog porijekla u pasa mogu biti posljedica invazije s protozoima iz roda *Babesia*, rikecijama *Anaplasma phagocytophilum* i *Ehrlichia canis*, te bakterijom *Leptospira interrogans* (FRY i McGAVIN, 2012.).

Infekcijske hemolitičke anemije čest su uzrok uginuća pasa u Republici Hrvatskoj gdje velik broj ugiba zbog višestrukog zatajenja organa uzrokovanog masivnom hemolizom. Psi ugibaju unatoč promptnoj primjeni etiološke terapije što nije rijetka pojava u slučajevima komplicirane babezioze i akutne leptospiroze.

Patoanatomski nalazi u uginulih jedinki su slični, gotovo identični, iako hemolitička kriza može biti posljedica infekcije različitim vrstama mikroorganizmima. Patoanatomski nalaz uključuje ikterus, hepatosplenomegaliju, diseminiranu intravaskularnu koagulopatiju i hemoglobinuričnu nefrozu. Rutinski patološki pregled uz paralelnu primjenu postmortalnih

seroloških, bakterioloških te rutinskih parazitoloških pretraga često nije dostatan da se izolira infektivni uzročnik anemije, kao niti da se isključi mogućnost koinfekcije. Mogućnost koinfekcija je osobito visoka zbog činjenice da protozoee, erlihije, rikecije i anaplazme dijele iste vektore, krpelje, koji dok se hrane krvlju pasa, mogu na njih prenijeti različite patogene.

Babesia canis canis, *Babesia canis vogeli* i *Babesia gibsoni* protozooni su roda *Babesia* koje parazitiraju unutar eritrocita domaćina uzrokujući pritom bolest zvanu babezioza, a njihovi su vektori krpelji *Rhipicephalus sanguineus* za *B. canis vogeli* i *Dermacentor reticulatus* za *B. canis canis* (BECK i sur., 2009.). Invazijski stadij uzročnika su merozoiti, nastali binarnom diobom, koji nastanjujući eritrocite uzrokuju njihovo raspadanje, odnosno intravaskularnu hemolizu praćenu povećanom eritrofagocitozom. Tipični citološki nalaz razmaza krvi uključuje nalaz babezija u paru 4 do 5 μm dužine u eritrocitima kruškolikog oblika (BROWN i sur. 2007.). Sekcijski nalaz životinje koja je uginula od akutne bolesti obilježavaju splenomegalija, ikterus, hemoglobinurija, otečeni i hemoglobinom obojani bubrezi te subepikardijalna i subendokardijalna krvarenja (FRY i McGAVIN, 2012.).

Anaplasma phagocytophilum je gram-negativan mikroorganizam iz roda *Rickettsiales* odgovoran za granulomatoznu anaplazmozu čovjeka i životinja, obligatno je intracelularan te ga se najčešće nalazi u neutrofilnim granulocitima (CHOMEL, 2011). Vektor ovog uzročnika je krpelj *Ixodes ricinus*, koji nakon uboda domaćina prilikom hranjenja prenosi mikroorganizme u obliku fagostoma u stanice (SHAW i sur., 2001.). Anaplazmoza uzrokuje anemiju koja je u većini slučajeva uzrokovana imunološki uvjetovanom ekstravaskularnom hemolizom. Patoanatomski nalazimo blijedo-ikterične sluznice, povećanu slezenu, ikteričnu jetru s dilatiranim i prepunjenim žučnim mjehurom. Također se nalaze diskoloracije pluća i emfizem te ekhimatoze epikarda i povećano srce (FRY i McGAVIN, 2012.).

Ehrlichia canis je gram-negativan mikroorganizam, također iz reda *Rickettsiales* koji se nalazi obligatno intracelularno u monocitima, rijetko u neutrofilnim granulocitima i uzrokuje monocitnu erlihiozu (CHOMEL, 2011). Vektor je krpelj *Rhipicephalus sanguineus*, čija se ženka zarazi *E. canis* dok se hrani krvlju psa u akutnoj fazi bolesti (SHAW i sur., 2001.). Morule *E. canis* su okrugle bazofilne strukture veličine $\frac{1}{2}$ eritrocita s granuliranom unutarnjom strukturom sastavljenom od bazofilnih elemenata unutar mononukleara (VALLI i sur., 2007.). Patoanatomski nalazi opisuju generaliziranu limfadenopatiju i splenomegaliju,

krvarenja na tankom crijevu i mokraćnom mjehuru te leptomeninge (FRY i McGAVIN, 2012.).

Hepatozoon canis je protozoon iz porodice *Hemogregarinidae* i obligatni je parazit leukocita i stanica retikuloendotelnog sustava (VOJTA i sur. 2009.). Vektor mu je *Rhipicephalus sanguineus*, kao i kod babezioze, međutim u odnosu na druge bolesti pasa koje prenose vanjski paraziti, osnovni put prijenosa ovog uzročnika je peroralan unos invadiranih krpelja. Patoanatomski nalaz na psu uključuje kaheksiju, mišićnu atrofiju koja je najočitija u temporalnoj regiji, anemiju, ikterične sluznice, povećanje jetre i slezene, kongestivne promjene u plućima i u probavnom sustavu, nefritis te piogranulome u mišićima i drugim tkivima. Ciste u kojima se mogu nalaziti meronti su tipičan nalaz u skeletnoj i srčanoj muskulaturi. Također nalaz cisti može biti prisutan u glatkoj muskulaturi tankog crijeva, masnom tkivu, jetri, slezeni, bubrezima, plućima i drugim organima (BANETH, 2011.).

Bartonella spp. je gram-negativna štapičasta bakterija iz porodice *Bartonellaceae*. Rod čini 16 vrsta, a 5 ih je izolirano iz psa: *Bartonella vinsoni subsp. Berkhoffi*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. washoenis* i *B. elizabethae* (GUPTIL, 2010.). Glavni vektor *Bartonella* spp. u psa su mačja buha *Ctenocephalides felis* te krpelji *Rhipicephalus sanguineus* i *Ixodes ricinus*. Do infekcije može doći i gutanjem fecesa inficiranih buha, ugrizima i ogrebotinama zaraženih mačaka. Postmortalnim pregledom životinje nalazimo splenomegaliju, ikterus, hemoglobinuriju, renomegaliju, subepikardijalna i subendokardijalna krvarenja te makrofagnu eritrofagocitozu u jetri, slezeni i koštanoj srži (OHAD i sur., 2010.).

Leptospira interrogans sp. je tanka, spiralna i pokretljiva gram-negativna bakterija 3 - 20 µm dužine i 0.5 µm širine sa kukastim završetkom. Najčešći serovarovi nađeni kod pasa su *Leptospira interrogans serovar canicola*, *L. interrogans serovar bratislava* i *L. interrogans serovar icterohaemorrhagiae*. Ova bakterija je raširena diljem svijeta, preživljava u toplom, vlažnom, neutralno do lužnatom tlu ili vodi stajaćici, a prirodna rezerva bakterija je u proksimalnim zavojitim tubulima bubrega i genitalnom traktu. Patoanatomski nalaz na psu uključuje ikterus, petehije i ekhimoze po sluznicama i serozama, te plućima i srcu, povećanje bubrega te crveno obojan urin. Najznačajniji patohistološki nalaz je na bubrezima i jetri gdje nalazimo nefritise, degeneracije i nekroze tubularnog epitela, edem i kortikalnu fibrozu bubrega, te portalnu limfocitarnu infiltraciju i hepatocelularnu degeneraciju, nekrozu i regeneraciju (FRY i McGAVIN, 2012.).

HIPOTEZA

Anemije mogu biti infektivnog i neinfektivnog porijekla te karakteriziraju akutno oboljenje pasa. Teško je po kliničkom nalazu, bez primjene specifičnih testova, razlikovati koji je uzročnik izazvao hemolizu. U Republici Hrvatskoj najčešći uzročnici su *Babesia canis* i *Leptospira interrogans* bez obzira što su dokazani i drugi uzročnici hemolitičkih anemija u pasa poput rikecija *Anaplasma phagocytophilum* i *Ehrlichia canis* te protozoona *Hepatozoon canis*. Brojni radovi opisuju klinički nalaz kod babezioze pasa sa detaljnim opisom hematoloških i biokemijskih promjena te sa jasnim mehanizmima nastanka bolesti. Također su molekularnim istraživanjima dokazani brojni uzročnici poput protozoona *Babesia canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni* te *Theileria annae* (*B. microti* – like). Istovremene invazije/infekcije mogu promijeniti uobičajnu sliku bolesti i karakteristične simptome što ujedno onemogućava pravilno liječenje. Istraživanja koja povezuju patoanatomski, histopatološki, serološki, citološki i molekularni nalaz su oskudna ili gotovo ne postoje. U Zavodu za veterinarsku patologiju postoje dva protokola za obdukciju pasa uginulih od posljedica hemolitičke anemije i to za *Babesia canis*, uzročnika babezioze i *Leptospiru interrogans*, uzročnika leptospiroze. Za ostale uzročnike hemolitičkih anemija ne postoji propisani protokol za uzorkovanje ciljnih tkiva u kojima bi se najlakše mogao dokazati uzročnik. Osnovni cilj ovog istraživanja je dokazati uzročnike hemolitičkih anemija molekularnim metodama u arhivskim slučajevima te povezati uzročnika sa specifičnim patoanatomskim i histopatološkim nalazom. Također je cilj odrediti da li je smrtnost u slučajevima babezioze povezana sa istovremenim invazijama/infekcijama drugim uzročnicima.

MATERIJALI I METODE

1. Supstrat istraživanja

Iz arhiva Zavoda za veterinarsku patologiju odabrano je dvadeset slučajeva uginuća pasa od posljedica hemolitičkih anemija koji su odbducirani u Zavodu za veterinarsku patologiju u razdoblju od siječnja 2009. do kraja prosinca 2012. godine. Slučajevi su odabrani prema ključnim riječima ikterus, splenomegalija, hepatomegalija i hemolitička anemija.

2. Arhiva obdukcijских nalaza

Na temelju ključnih riječi iz arhiva su odabrani i u istraživanje uključeni slučajevi uginuća petnaest pasa i pet kuja. U tablici 1. navedeni su prema podacima o dobi, spolu, pasmini, uzroku uginuća životinje i konačnom mišljenju obducenta o kojoj se etiologiji hemolitičke anemije radi. U istraživanje je uključen i pas sa adenokarcinomom gušterače i recidivirajućim pankreatitisom kao negativna kontrola.

Tablica 1. Prikaz odabranih slučajeva

REDNI BROJ	HP	PASMINA	SPOL	DOB	UZROK UGINUĆA	MIŠLJENJE OBUDUCENTA
1	09-347	engleski koker španijel	M	15 g	edem pluća	babezioza
2	09-366	engleski seter	M	7 g	eutanazija	babezioza
3	09-465	njemački ovčar	M	2 mj	edem pluća	babezioza
4	09-757	šarplaninac	M	5 g	edem pluća	babezioza
5	10-026	križanac	Ž	2 g	septički šok	babezioza
6	10-343	križanac	M	9 g	septički šok	babezioza
7	10-390	križanac	M	7 g	edem pluća	-
8	10-867	križanac	Ž	10 g	edem pluća	leptospiroza
9	10-898	belgijski ovčar	M	2 g	edem pluća	leptospiroza
10	11-338	križanac	M	5 g	septični šok	leptospiroza
11	11-374	križanac	M	5 g	septički šok	leptospiroza
12	11-560	pinč	Ž	4 g	septički šok	babezioza
13	11-728	mađarska vižla	M	3 g	septički šok	babezioza
14	11-867	čaju-čaju	M	3 mj	edem pluća	babezioza
15	12-078	samojed	M	2 mj	edem pluća	-
16	12-298	škotski ovčar	M	10 g	septički šok	bakterijemija
17	12-380	škotski ovčar	M	6 g	hipovolemički šok	adenokarcinom gušterače
18	12-505	engleski koker španijel	Ž	9 g	septički šok	leptospiroza
19	12-656	škotski ovčar	M	12 g	septički šok	babezioza
20	12-869	belgijski ovčar	Ž	3 mj	septični šok	leptospiroza

Obdukcijski nalazi klasificirani su prema patoanatomskim nalazima na organima i tkivima. U istraživanje su uključene isključivo jedinke u kojih su uzorkovani svi ili većina ciljnih organa i tkiva koji su inače najviše oštećeni u hemolitičkim krizama. Odabrani su sljedeći ciljni organi: slezena, jetra, bubrezi, pluća i srce. Osim parenhimskih organa u istraživanje je uključen i nalaz boje sluznica i potkožja te boja urina. Patoanatomske lezije grupirane su prema stupnju i načinu oštećenja. Rezultati obdukcije onih organa koji nisu bili zastupljeni u svakom od odabranih slučajeva su zabilježeni, ali nisu uključeni u rezultate.

U slaganju kriterija i stupnja oštećenja osim obdukcijskog nalaza korištena je i fotodokumentacija. Rezultati dopunskih dijagnostičkih testova također su prikupljeni i tabelarno prikazani uz svaki uzorak.

U rutinskom dijagnostičkom postupku Zavoda za veterinarsku patologiju pri obradi psa uginulog od hemolitičke anemije, prikuplja se krv iz srčanih šupljina koja se šalje na mikroskopsku aglutinaciju - MAT za dokazivanje leptospira. Također, paralelno se rade citološki otisci bubrega, slezene i jetre koji se bojaju metodom po Wrightu za mikroskopsko dokazivanje piroplazmi u eritrocitima. Ovaj postupak provodi se isključivo na svježim lešinama, jer uznapređovali procesi autolize izazivaju jaku postmortalnu hemolizu koja onemogućava izvođenje navedenih pretraga.

3. Arhiva histopatoloških uzoraka

Svi histopatološki uzorci tkiva analizirani su slijepom metodom, bez uvida u ranije dokazanu etiologiju. Kriteriji mikroskopske analize utemeljeni su na literaturnim podacima vezanim uz specifičnosti oštećenja organa koje nastaje uslijed hemolitičke anemije. Rezultati histoloških lezija su prikazani tablično prema broju histopatološkog protokola - HP za svaku jedinku te oznakom + ili – za prisutnost ili odsutnost histomorfološkog obilježja u ciljnom organu.

SLEZENA: obilježja ekstravaskularne hemolize (EVH): eritrofagocitoza i hemosideroza; intravaskularna hemoliza; obilježja okluzije i oštećenja krvnih žila: fibrinoidna oštećenja krvnih žila, leukocitostaza, tromboza; posljedice hipoksičnog oštećenja: nekroza i krvarenje; ekstramedularna hematopoeza (EMH).

JETRA: promjene na hepatocitima: disocijacija, atrofija i nekroza; promjene u sinusoidama: nakupljanje edemske tekućine i histiocitoza; staza žuči; promjene portalnih krvnih žila: tromboza.

PLUĆA: promjene vezane uz pojačanu propusnost krvnih žila alveolarnih septi: alveolarni edem, alveolarna krvarenja; promjene na krvnim žilama alveolarnih septi i intersticija: tromboza, intersticijska krvarenja, leukocitostaza; znakovi ekstramedularne hematopoeze.

SRCE: promjene vezane uz krvne žile miokarda: tromboza, krvarenja i leukocitostaza; promjene na srčanim vlaknima: nekroze, miokarditis i kalcifikacija.

BUBREG: promjene u lumenu tubula: hemoglobinurični odljevi, bilirubinurični odljevi; promjene vezane uz krvne žile intersticija: akutna kortikalna nekroza, fibrinoidna promjena krvnih žila, leukocitostaza; upalne promjene intersticija: nefritis.

4. Kriteriji uzorkovanja tkiva za DNK izolaciju

Pregledom arhive parafinskih blokova utvrđeno je da su slezene uzorkovane u svim odabranim slučajevima te su zbog toga odabrane kao ciljno tkivo daljnjih epidemioloških molekularnih analiza. Osim dostupnosti i uniformnosti uzoraka slezene ona je odabrana i zbog svoje fiziološke uloge uklanjanja oštećenih eritrocita iz organizma, odnosno visokog postotka ekstravaskularne hemolize u hemolitičkim anemijama.

5. Dobivanje tkivnih isječaka

Svaki parafinski blok slezene rezan je na kliznom mikrotomu (Carl Zeiss HYRAX M 25 Rotary Microtome) u tkivne isječke debljine 30 µm. Iz parafinskih blokova ovisno o dimenzijama tkiva slezene uklopljenog u blok izrezano je 3 do 7 isječaka tkiva i parafina. Između svakog uzimanja uzorka slezene glava mikrotoma je mehanički očišćena električnim usisivačem od fragmenata tkiva, oprana ksilolom, a mogući ostaci tkiva uklonjeni su DNA-off (PureBiotech) tekućinom u svrhu potpunog uklanjanja mogućnosti prenošenja DNK materijala iz jednog uzorka na drugi. Uzorci su pohranjeni u plastične tubice i označeni HP brojem. Postupak se proveo u histološkom laboratoriju Zavoda za veterinarsku patologiju.

6. Deparafinizacija

Postupak deparafinizacije tkivnih isječaka slezene učinjen je pomoću ksilena i etanola u Laboratoriju za parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta. U plastične epruvete od 2 ml u kojima se nalaze pripremljeni parafinski rezovi je dodano 1.5 mL ksilena sa ciljem rastapanja parafina. Epruvete su vrtložene tijekom 15 do 30 sekundi i ostavljene na sobnoj temperaturi 10 minuta. Potom centrifugiran na 14000 okr/min tijekom pet minuta kako bi se oborile sve čestice. Supernatant je zatim otpipetiran, a cijeli postupak je ponovljen dva puta. Nakon deparafinizacije sediment je ispran sa 99.6% etanolom na način da je dodano 1.5mL etanola koji je vrtložen tijekom 15 do 30 sekundi i potom centrifugiran na 14000 okr/min tijekom pet minuta. Supernatant je potom otpipetiran, a postupak je ponovljen dva puta. Nakon što je uklonjen etanol otvorene epruvete su ostavljene na 37°C dok etanol nije u potpunosti ispario. Deparafinizacija i izdvajanje DNK učinjeno je prema najboljem protokolu (CHAN i sur., 2001).

7. Izdvajanje DNK

Izdvajanje DNK učinjen je komercijalnim DNA blood and tissue kitom (Qiagen, Hilden, Njemačka) uz korištenje automatskog sustava za izdvajanje DNK „QIACUBE“ (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. U ranije pripremljene uzorke dodano je 180µl pufera ATL i 20 µl proteinaze K. Ovako pripremljena mješavina vrtložena je 15 sekundi, i centrifugirana tijekom jedne minute na 14000 okr/min kako bi se oborile sve čestice. Uzorci su potom inkubirani 18 sati na 56°C. Po završenoj inkubaciji uzorci su prebačeni u automatski sustav za izdvajanje DNK „QIACUBE” u kojem su ranije uložene i obilježene kolone te puferske otopine AL, AW1 i AW2, 99,6% etanol te otopina AE za ispiranje vezane DNK. Nakon završetka automatske izolacije dobiveno je 200 µl izdvojene DNK koja će biti korištena u analizi PCR-om.

8. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom je korištena kako bi se umnožili ciljani odsječci pojedinih uzročnika. U svakoj reakciji korištene su specifične uzvodne i nizvodne početnice, „master mix“ Emerald (Takara), voda slobodna od RNK/DNKaza i ranije izdvojena DNK. Ukupan volumen po PCR reakciji bio je 50 µl, a sastojala se od 25 µl „master mix“, po 1 µl

svake početnice specifične za ciljane mikroorganizme, 18 µl vode te 5 µl DNK. Reakcije su se odvijale u toplokružnicima (aparati za termocikliranje ili engl. termocycler) Veriti, 2720 i 9700 (Applied Biosystems). Pri umnažanju ciljanih uzročnika korištene su pozitivne i negativne kontrole.

A) *Babesia sp.*

Za dokazivanje protozoona iz roda *Babesia* umnožen je ciljani odsječak male podjedinice ribosomalne rRNK (engl. small subunit of ribosomal RNA, ssu- rRNA) od oko 560 parova baza prednje početnice 5'- CCCTTCATCGGTGGTAACTT-3' i stražnje početnice 5'-GTGGCCACCACTCCCGTGCC-3' (BECK i sur., 2009.).

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

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C kroz 45 s;
2. prihvaćanje početnica pri temperaturi od 50°C kroz 45 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C kroz 60 s.

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

B) *Hepatozoon canis*

Za dokazivanje protozoona *Hepatozoon canis* umnožen je ciljani odsječak male podjedinice ribosomalne rRNK (engl. small subunit of ribosomal RNA, ssu- rRNA) od oko 660 parova baza prednje početnice HepF 5'- ATACATGAGCAAAATCTCAAC -3' i stražnje početnice HepR 5'- CTTATTATTCATGCTGCAG -3' (INOKUMA i sur. 2002.).

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

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C kroz 45 s;
2. prihvaćanje početnica pri temperaturi od 50°C kroz 45 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C kroz 60 s.

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

C) *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys* i *Ehrlichia canis*

Za dokazivanje anaplazmi i erlihija umnažan je ciljani odsječak male podjedinice ribosomalne rRNK od oko 345 parova baza korištenjem prednje početnice EHR16SD 5' - GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC 3' i stražnje početnice EHR16S 5'- TAGCACTCA TCG TTT ACA GC -3' (BROWN i sur. 2001). Ovim protokolom je moguće umnožiti gotovo sve *Anaplasma* / *Ehrlichia* vrste. Reakcija se sastojala od inicijalne 15-o minutne denaturacije, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa kako sljede:

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C kroz 30 s;
2. prihvaćanje početnica pri temperaturi od 55°C kroz 30 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C kroz 30 s.

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

D) *Leptospira interrogans*

Uzorci su pretraženi na prisutnost bakterija *Leptospira interrogans* prema BRANGER i sur. (2005). Korištena je prednja početnica Adia214 5' - GCAAGCATTACCGCTTGTGG-3' i nizvodna početnica Adia215 - 5' -TGTTGGGGAAATCATACGAAC - 3' kojima se umnaža specifičan odsječak hap1 gena veličine 262 pb.

Reakcija se sastojala od inicijalne 15-o minutne denaturacije, nakon čega je uslijedilo 45 ciklusa kako sljede:

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C kroz 15 s;
2. prihvaćanje početnica pri temperaturi od 56°C kroz 35 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C kroz 40 s.

Nakon posljednjeg ciklusa, produženje je provedeno na 72°C tijekom 10 minuta. Reakcija je automatski zaustavljena pri temperaturi od 4°C.

E) *Bartonella* sp.

Za dokazivanje bartonela umnažan je ciljani odsječak unutarnje prepisujuće razmaknice veličina od 176 do 452 pb. Korištena je prednja početnica Bart/16-23F 5' - TTGATAAGCGTGAGGTCGGAGG - 3' i stražnja početnica Bart/16-23R 5' - CAAAGCAGGTGCTCTCCCAG - 3' (CORAL GARCIA i sur. 2008). Ovim protokolom

moguće je umnožiti sve vrste bakterija iz roda *Bartonellae* u pasa. Reakcija se sastojala od inicijalne 15-o minutne denaturacije, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa kako sljedi:

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C kroz 30 s;
2. prihvaćanje početnica pri temperaturi od 64°C kroz 60 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C kroz 30 s.

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

Prisutnost umnoženih odsječaka ciljanih veličina provjerena je pomoću kapilarne elektroforeze Qiaxcel (Qiagen, Hilden, Germany) uz korištenje screening kita.

REZULTATI

Četnaest od dvadeset pasa je citološki pretraženo na prisutnost merozoita protozoona *Babesia* spp. u eritrocitima. Upravo ova postmortalna pretraga otisaka organa pokazala se najosjetljivijom od svih dijagnostičkih metoda. Od sedam (50%) citološki pozitivnih uzoraka 09-465, 09-757, 10-26, 10-343, 11-728, 11-867 i 12-656 ista etiološka dijagnoza je potvrđena PCR pretragom u tri uzorka 09-465, 09-757 i 11-867 (15 %) u kojih je dokazan specifičan odsječak veličine 560 pb. PCR pretragom uzorka slezene babezije su dokazane i u uzorku 09-366 koji je bio negativan citološkom pretragom. U uzorku 09-465 je osim *Babesia* spp. dokazan i specifičan odsječak DNK protozoona *Hepatozoon* spp. (660 pb). Isti uzročnik je dokazan u uzorku 10-343 koji je ujedno i citološki pozitivan na babezije. Jedino su u ova dva uzorka (10%) dokazane istovremene invazije sa pripadnicima iz rodova *Babesia* i *Hepatozoon*.

Na prisutnost bakterija iz roda *Leptospira* pretraženo je devet uzoraka krvi iz srca, od kojih su u četiri uzorka (10-867, 11-374, 12-505 12-869) dokazana protutijela. U navedenim uzorcima nisu dokazani drugi uzročnici. Uzgoj *Leptospira* spp. kao ni lančana reakcija polimerazom nisu dale pozitivan nalaz niti u jednom od četiri pretražena bubrega uzeta od serološki pozitivnih pasa. Također PCR-om specifičan odsječak DNK nije dokazan niti u jednom uzorku slezene korištenom u ovom istraživanju.

Svi uzorci pretraženi na prisustvo specifičnih odsječaka DNK vrsta iz rodova *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* i *Rickettia* završili su negativnim rezultatom. Uzorak 12-380 uvršten je u istraživanje kao negativna kontrola, jer se je u ovom slučaju radilo o posthepatičkom ikterusu nastalom zbog adenokarcinoma pankreasa.

U 7 uzoraka (35%) nije dokazan niti jedan uzročnik.

Zbirni prikaz svih dokazanih uzročnika molekularnim, serološkim i citološkim metodama prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz rezultata citološke pretrage otisaka; molekularne pretrage DNK uzoraka izoliranih iz slezene na više etioloških čimbenika, te kulturelne i serološke pretrage na prisutnost *Leptospira* spp. u tkivu bubrega i protutijela na *Leptospira* spp. u serumu (h - hemoliza)

METODA DIJAGNOSTIKE	09-347	09-366	09-465	09-757	10-026	10-343	10-390	10-867	10-898	11-338	11-374	11-560	11-728	11-867	12-078	12-298	12-505	12-380	12-656	12-869	
<i>Babesia</i> spp. citologija	-	h	+	+	+	+	-	-	/	/	/	h	+	+	/	h	-	/	+	/	
<i>Babesia</i> spp. PCR	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hepatozoon</i> <i>canis</i> . PCR	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ehrlichia</i> spp. PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Anaplasma</i> spp. PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bartonella</i> spp. PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rickettia</i> spp. PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptospira</i> spp. PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptospira</i> spp. serologija	/	/	/	/	/	/	/	+	/	-	+	-	/	-	-	-	+	/	/	+	
<i>Leptospira</i> spp. renokultura	/	/	/	/	/	/	/	-	/	-	-	-	/	-	-	-	-	/	/	-	

1. Patoanatomski nalazi

Difuzno povećanje jetre (hepatomegalija) je bila najučestaliji patomorfološki nalaz u ovom istraživanju, a utvrđena je u 95% uzoraka. Samo jedan od ispitanih pasa nije imao povećanu jetru i u te jedinice nije utvrđen uzročnik hemolize.

Ikterus je dokazan u 85% obduciranih pasa. U dva od tri psa koji nisu imali ikterus potvrđena je babezioza, dok u psa pod brojem 09-347 nije dokazan nijedan uzročnik.

Splenomegalija je bila prisutna u 16 uzoraka (80%). U dva psa bez potvrđene etiološke dijagnoze (11-338, 12-078) i u psa koji predstavlja negativnu kontrolu (12-380) te u jednog leptospira serološki pozitivnog psa (10-867) nije dokazana splenomegalija.

Povećanje bubrega zabilježeno je u 45% slučajeva. U tri uzorka su citološki dokazane babezije, u tri serološki leptospire, dok u tri uzorka nije dokazan uzročnik (Tablica 3.). Obducenti su zabilježili hematuriju/hemogloburiju u svega 50% slučajeva. Važno je istaknuti da je ovaj nalaz bio prisutan u svim slučajevima babezioze. U nekim slučajevima mokraćni mjehur i njegov sadržaj nisu opisani.

Edem pluća utvrđen je u 85% obduciranih pasa. U ove slučajeve uključeni su svi babeziosi i leptospirozni psi te pet pasa bez etiološke dijagnoze. Krvarenja u plućnom parenhimu inače predstavljaju rijedak nalaz, a opisana su u 40% pasa bez značajnije etiološke distribucije ove lezije. Makroskopski vidljiva oštećenja miokarda utvrđena su u 45% slučajeva i zanimljivo je da se u slučajevima babezioze nije javljao ovaj simptom osim kod slučaja koinfekcije te u kazusu broj 11-728. Subendokardijalna krvarenja nađena su u samo 40% slučajeva i nemaju značajniju etiološku distribuciju.

Tablica 3. Prikaz patoanatomskih nalaza u kojem je slučaj 12-380 je negativna kontrola (B – *Babesia* sp., L – *Leptospira interrogans*, H – *Hepatozoon canis*)

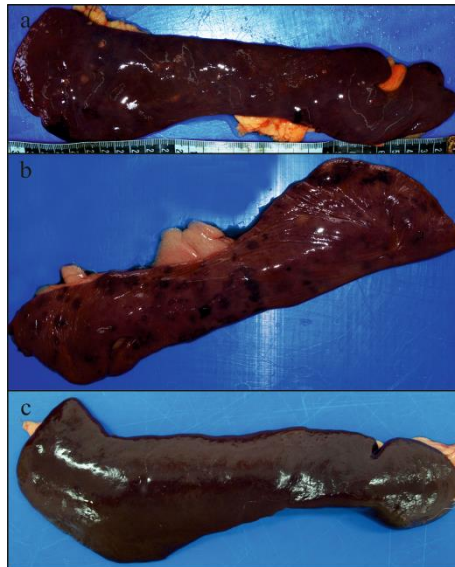
Patološke promjene	09-347	09-366	09-465	09-757	10-026	10-343	10-390	10-867	10-898	11-338	11-374	11-560	11-728	11-867	12-078	12-298	12-505	12-380	12-656	12-869
UZROČNIK	/	B	B, H	B	B	B, H	/	L	/	/	L	/	B	B	/	/	L	/	B	L
IKTERUS	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
SPLENOMEGALIJA	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
HEPATOMEGALIJA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RENOMEGALIJA	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
TAMNI URIN	-	+	+	+	+	/	+	-	-	+	+	-	+	+	/	-	-	-	+	-
EDEM PLUĆA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
KRVARENJA U PLUĆIMA	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
INFARKT MIOKARDA	-	-	+	-	/	+	-	+	+	+	/	-	+	-	-	+	+	+	-	-
SUBENDOKARDIJALNA KRVARENJA	+	+	-	+	/	-	-	+	-	+	/	+	+ ²	-	-	+ ³	-	+	- ⁴	-

¹ Jaka perikardijalna, subendokardijalna i subepikardijalna krvarenja;

² subepikardijalna krvarenja;

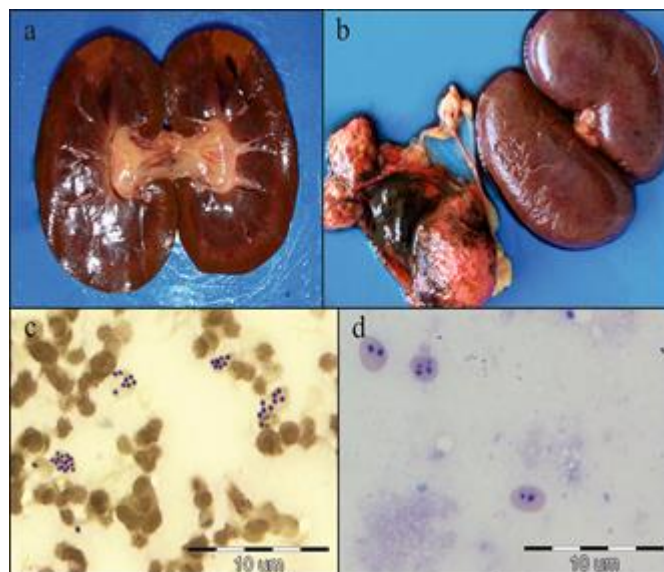
³ jaka subendokardijalna i subepikardijalna krvarenja;

⁴ subepikardijalna krvarenja

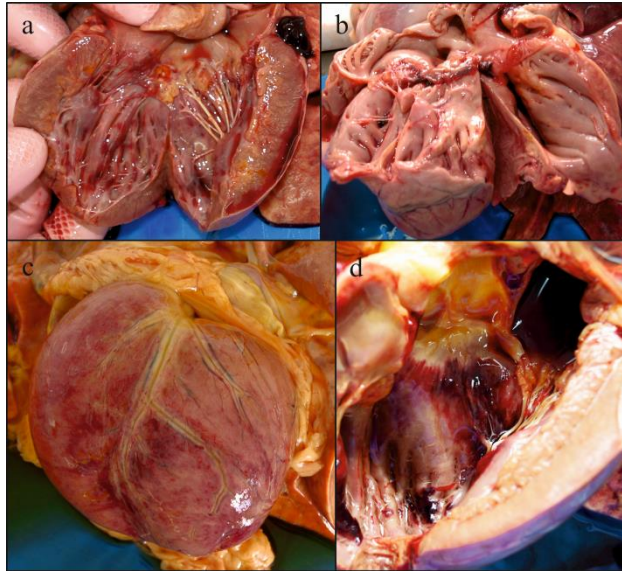


Slika 4.

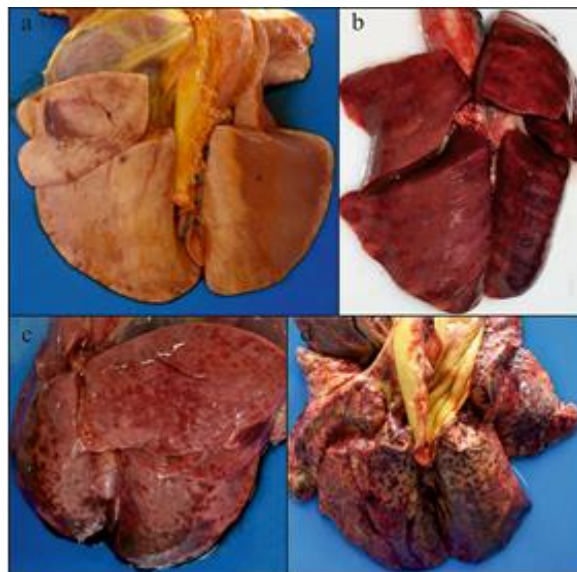
Slika 1. a) Slezena psa 12-298 bez utvrđene etiologije. Difuzna splenomegalija mesnate konzistencije. Slezena tupih zaobljenih rubova sa diseminiranim nepravilnim područjima promjera 4 do 6 mm bijele boje koja predstavljaju zone infarkta. **b) Slezena psa 09-347 bez utvrđene etiologije.** Difuzna splenomegalija mesnate konzistencije. Slezena tupih zaobljenih rubova sa diseminiranim nepravilnim područjima tamnocrvene boje koja se mjestimice preklapaju i predstavljaju zone akutnih krvarenja. Promjer krvarenja iznosi od 4 do 10 mm. **c) Slezena psa 11-867 u kojeg je utvrđena babezioza.** Difuzna splenomegalija mesnate konzistencije, crno-crvene boje. Slezena tupih i zaobljenih rubova.



Slika 2. a) Bubreg psa 298-12 bez utvrđene etiologije. Na kaudalnom polu bubrega ističe se trokutasto smeđe područje 7x14 mm koje predstavlja zonu akutnog infarkta uslijed tromboze ogranka bubrežne arterije. **b) Bubreg psa 12-656 s utvrđenom babeziozom.** Difuzno povećanje bubrega. Vidljiv nepravilan gubitak supstance kore u zoni intersticijskog glomerulonefritisa te sitna točkasta krvarenja. Mokraćni mjehur, otvorenog lumena sadrži malu količinu tamnog urina - hemoglobinurija. **c) Otisak bubrega, pas 09-757, Giemsa x 100.** Citološki dokaz babezioze. U eritrocitima prisutne intracelularne okrugle piroplazme. **d) Otisak bubrega, pas 09-465, Giemsa x 100.** Citološki dokaz babezioze. U rijetkim očuvanim eritrocitima prisutne intracelularne malobrojne okrugle piroplazme.



Slika 3. a) Srce psa 12-298 bez utvrđene etiologije. Po miokardu te ispod perikarda i epikarda rasijana nepravilna područja smeđe-žute i crvene boje dimenzija 4x7 mm; hemoragični i ishemični infarkti. **b) Srce psa 10-343 u kojeg je dokazana koinfekcija babezioze i hepatozoonoze.** Ispod endokarda desne klijetke vidljivo je nekoliko nepravilnih područja žućkasto bijele boje mineralne konzistencije - distrofična kalcifikacija. **c) Srce psa 11-728 u kojeg je utvrđena babezioza.** Pod epikardom srca vidljive sitna okrugla tamnocrvena područja koja mjestimice konfluiraju i predstavljaju mjesta petehijalnih subepikardijalnih krvarenja. **d) Srce psa 11-867 u kojeg je utvrđena leptospiroza.** Ispod endokarda srca vidljiva masivna prugasta tamnocrvena područja koja mjestimice konfluiraju i predstavljaju mjesta subendokardijalnih krvarenja.



Slika 4. a) Pluća psa 11-728 u kojeg je utvrđena babezioza. Parenhim i pridružene tkivne strukture izrazito ikterične. Pluća difuzno povećana svijetlo žute boje, mesnate konzistencije sa rijetkim točkastim krvarenjima. **b) Pluća psa 12-869 u kojeg je utvrđena leptospiroza.** Parenhim smeđe crvene boje i mesnate konzistencije. Prisutna rijetka točkasta krvarenja. **c) Pluća psa 11-867 u kojeg je utvrđena babezioza.** Pluća difuzno povećana, parenhim ružičasto crvene boje i mesnate konzistencije. Prisutne učestale petehije koje konfluiraju u ventralnim područjima plućnih režnjeva. **d) Pluća psa 10-867 u kojeg je utvrđena leptospiroza.** Pluća difuzno povećana, mramoriranog izgleda. Izmjenjuju se ikterične zone i difuzno rasijane zone točkastih krvarenja koja su iznimno obilna te se međusobno preklapaju. Pridružene tkivne strukture su izrazito ikterične.

2. Histopatološki nalazi

A) Histopatološki rezultati slijepa mikroskopske analize slezene

Eritrofagocitoza je dokazana u 85% uzoraka. U svim uzorcima, u kojima su dokazane babezije te tri od četiri psa u kojih su serološkom pretrgom krvi iz srca dokazane leptospire bila je prisutna EVH. Hemosideroza je bila prisutna u 75% slezena. Svi babeziozni psi imali su hemosiderozu slezene, osim onih s istovremenom invazijom protozoonom *Hepatozoon canis*. Intravaskularna hemoliza je bila utvrđena u samo dva slučaja u kojima nije dokazan uzročnik. Tromboza krvnih žila slezene je bila dokazana u 35% pregledanih uzoraka. Ovaj nalaz nije bio povezan niti s jednim uzročnikom. Fibrinoidna promjena krvnih žila bila je utvrđena u dva babeziona psa u kojih je bila prisutna i tromboza krvnih žila. Leukocitostaza je zabilježena u tri uzorka pregledanih slezena leptospiroznih pasa. Ekstramedularna hematopoeza zabilježena je u četiri slučaja i ne može se povezati niti s jednim od uzročnika. Prikaz mikroskopskih lezija nađenih u tkivu slezene nalazi se u Tablici 4.

Tablica 4. Slezena – rezultati histopatološke pretrage

SLEZENA	09-347	09-366	09-465	09-757	10-026	10-343	10-390	10-867	10-898	11-338	11-374	11-560	11-728	11-867	12-078	12-298	12-505	12-380	12-656	12-869
Uzročnik	/	B	B, H	B	B	B, H	/	L	/	/	L	/	B	B	/	/	L	/	B	L
Tromboza	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Nekroza	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Krvarenja	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Leukocitostaza	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Ekstramedularna hematopoeza	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Eritrofagocitoza	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Hemosideroza	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Intravaskularna hemoliza	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrinoidna promjena krvnih žila	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

B) Histopatološki rezultati slijepa mikroskopske analize bubrega

Nalaz hemolitičkih cilindara bio je prisutan u 73% uzoraka i predstavlja najznačajniji nalaz na uzorcima tkiva bubrega pasa s hemolitičkim anemijama. Hemoglobinska cilindrija je zabilježena u sedam od osam uzoraka babezičnih pasa, tri leptospirozna psa i četiri uzorka pasa bez dokazanog uzročnika. Nalaz žučnih cilindara bio je prisutan u 57% uzoraka bubrega pasa. Nefritis je prisutan u 52% uzoraka. U 21% slučajeva prisutna je kortikalna nekroza. Leukocitostaza je prisutna u 15% uzoraka. Tromboza je prisutna u 10% uzoraka, dok je fibrinoidna promjena krvnih žila prisutna u 21% uzoraka. Za histopatološku analizu nije uzorkovan bubreg u slučaju psa 10-026. Svi dobiveni rezultati nisu bili specifični te se nisu mogli povezati s nijednim uzročnikom. Svi rezultati histološke pretrage bubrega prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Bubreg – rezultati histopatološke pretrage

BUBREG	09-347	09-366	09-465	09-757	10-026	10-343	10-390	10-867	10-898	11-338	11-374	11-560	11-728	11-867	12-078	12-298	12-505	12-380	12-656	12-869
Uzročnik	/	B	B,H	B	B	B,H	/	L	/	/	L	/	B	B	/	/	L	/	B	L
Kortikalna nekroza	+	-	-	-	/	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Žučni cilindri	+	+	-	+	/	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Hem. cilindri	+	+	+	+	/	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Nefritis	+	+	-	-	/	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Tromboza	-	-	-	-	/	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Leukocitostaza	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Fibrinoidna promjena krvnih žila	+	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

C) Histopatološki rezultati slijepa mikroskopske analize jetre

Edem jetre prisutan je u 66% uzoraka jetre i to u svim uzorcima babezičnih pasa, u jednom uzorku leptospiroznog psa te u jednom uzorku psa kod kojeg etiologija nije dokazana. U uzorcima u kojima je prisutan edem jetre, zabilježena je i atrofija hepatocita. Također, atrofija hepatocita prisutna je i u jednom leptospiroznom psu kod koje nije bilo edema. Staza žuči bila je prisutna u 61% slučajeva i to u svih babezičnih pasa. Histiocitoza je bila prisutna u 50% uzoraka, nekroza u 27% pretraženih, a tromboza u 16% uzoraka te ih se nije moglo povezati ni s jednim uzročnikom. Važan nalaz predstavlja disocijacija hepatocita koja je

zabilježena u samo 2 slučaja leptospiroze. Za histopatološku analizu nije uzorkovana jetra u slučaju psa 10-390 i 11-338. Rezultati su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Jetra – rezultati histopatološke pretrage

JETRA	09-347	09-366	09-465	09-757	10-026	10-343	10-390	10-867	10-898	11-338	11-374	11-560	11-728	11-867	12-078	12-298	12-505	12-380	12-656	12-869
UZROČNIK	/	B	B,H	B	B	B,H	/	L	/	/	L	/	B	B	/	/	L	/	B	L
Nekroze	+	-	+	-	-	+	/	-	-	/	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Edem	+	+	+	+	+	+	/	-	-	/	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Histiocitoza	+	+	-	+	-	-	/	-	-	/	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Staza žuči	-	+	+	+	+	+	/	-	-	/	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Atrofija	+	+	+	+	+	+	/	+	-	/	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Disocijacija st.	-	-	-	-	-	-	/	+	+	/	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Tromboza	+	-	-	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

D) Histopatološki rezultati slijepe mikroskopske analize pluća

Od 20 pregledanih pasa uzorkovano je i pregledano 18 tkivnih isječaka pluća. Svi rezultati histološke pretrage mikroskopskih lezija nađenih na tkivu pluća prikazani su u Tablici 7. Alveolarni edem je najučestalija patološka promjena utvrđena u 83% pasa sa hemolitičkim anemijama. U 12 pasa koji su razvili edem pluća utvrđena je leukocitostaza alveolarnih septi što čini 67% uzoraka. Ova promjena ustanovljena je kod svih babezioza pozitivnih pasa osim kod jednog. Tromboza, krvarenje i megakariocitoza zabilježeni su u malom broju uzoraka pluća bez obzira na uzročnika.

Tablica 7. Pluća – rezultati histopatološke pretrage

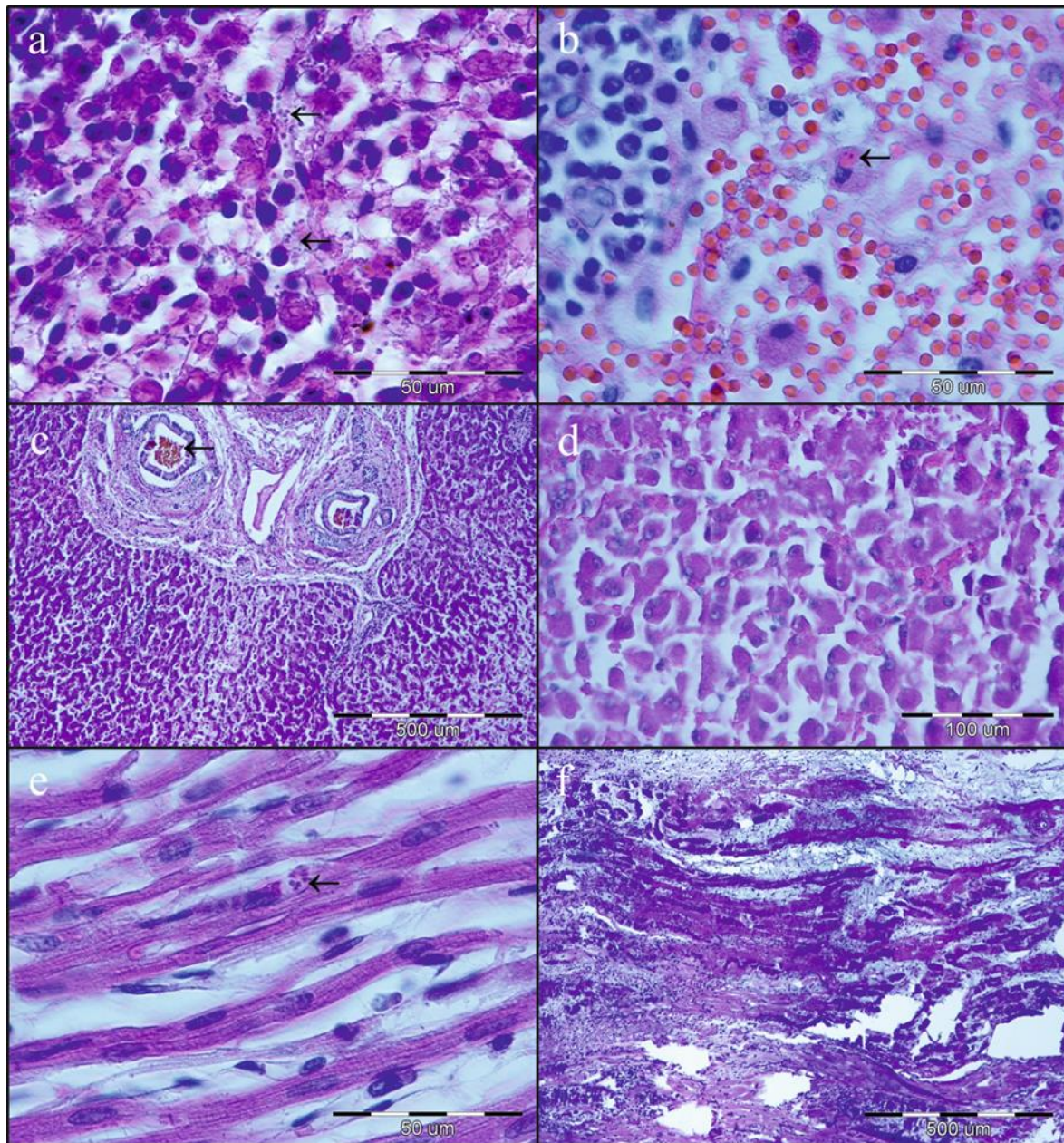
PLUĆA	09-347	09-366	09-465	09-757	10-026	10-343	10-390	10-867	10-898	11-338	11-374	11-560	11-728	11-867	12-078	12-298	12-505	12-380	12-656	12-869
UZROČNIK	/	B	B,H	B	B	B,H	/	L	/	/	L	/	B	B	/	/	L	/	B	L
Edem	/	+	+	+	/	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Leukocitost.	/	+	+	+	/	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
Tromboza	/	-	-	+	/	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Krvarenje	/	-	-	-	/	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Megakariocitoza	/	+	+	-	/	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-

E) Histopatološki rezultati slijepa mikroskopske analize srca

Od 20 pasa uključenih u istraživanje uzorkovano je i pregledano 18 tkivnih isječaka srca. Prikaz mikroskopskih lezija nađenih u tkivu srca nalazi se u Tablici 8. Najučestalije patološke promjene zabilježene u srcu su krvarenja i miokarditisi. Miokarditis je zabilježen u 39%, dok su krvarenja zabilježena u 44% pretraživanih uzoraka. U pasa s istovremenim invazijama (*Babesia sp./Hepatozoon canis*) dokazan je najveći broj promjena.

Tablica 8. Srce – rezultati histopatološke pretrage

SRCE	09-347	09-366	09-465	09-757	10-026	10-343	10-390	10-867	10-898	11-338	11-374	11-560	11-728	11-867	12-078	12-298	12-505	12-380	12-656	12-869
UZROČNIK	/	B	B, H	B	B	B, H	/	L	/	/	L	/	B	B	/	/	L	/	B	L
Miokarditis	-	-	+	-	/	+	-	+	+	+	/	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Kalcifikati	-	-	-	-	/	+	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tromboza	+	-	+	-	/	+	-	-	-	-	/	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Nekroza	-	-	+	-	/	+	-	-	-	-	/	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Leukocitostaza	+	-	+	-	/	+	-	-	-	-	/	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Krvarenja	-	-	+	-	/	+	-	+	+	-	/	-	+	-	-	-	+	+	+	-



Slika 5. a) Slezena, štene 09-465, HE x 100. Histiocitoza crvene pulpe; Donjom strelicom označena ekstravaskularna hemoliza (eritrocit invadiran piroplazmama fagocitiran u makrofagu). Posljedica intravaskularne hemolize (brojne piroplazme slobodne u sinusoidi) označena gornjom strelicom. **b) Slezena, pas 10-390, HE x 100.** Krvarenje u crvenoj pulpi; Eritrofagocitoza; strelicom označena fagocitoza eritrocita invadirana s dvije piroplazme (ekstravaskularna hemoliza). **c) Jetra, štene 09-465, HE x 10.** Strelicom označen jedan žučni kanalić u portalnom području prepunjen žuči (staza žuči); Prostor sinusoida u jetrenom parenhimu proširen i naglašen te ispunjen proteinskom tekućinom (edem); Hepatociti smanjeni i razmaknuti (kompresivna atrofija). **d) Jetra, kuja 10-867, HE x 40.** Arhitektura organa narušena; Hepatociti nisu organizirani u gredice (disocijacija hepatocita). **e) Srce, štene 09-465, HE x 100.** Miociti razmaknuti edemskom tekućinom; Strelicom označene ekstracelularne piroplazme. **f) Srce, pas 10-343, HE x 10.** Potpuni gubitak arhitekture miokarda. Vidljive tamnoplave zone nekroze sa obilnim depozitima soli kalcija (distrofična kalcifikacija).

RASPRAVA

U ovom istraživanju pretraživani su uzorci pasa uginulih od hemolitičke anemije. Najučestaliji uzročnik (40%) bio je protozoon *Babesia* sp. dokazan citološki u 7 uzoraka i lančanom reakcijom polimerazom potvrđen u tri, dok je svega jedan bio pozitivan PCR-om, a negativan citološki. Kako nije provedeno određivanje nukleotidnih sljedova, za pretpostaviti je da se radi o vrsti *B. canis* (*B. canis canis*) koja je dokazana u 99% pasa s tipičnom babezozom i nalazom hemolitičke anemije (BECK i sur., 2009.). Osjetljivost citološke postmortalne dijagnostike babezioze neposredno ovisi o stupnju postmortalne hemolize eritrocita. Tako je u jednom uzorku sa uznapreovalom hemolizom dokazana babezija PCR-om, dok je citološki bila negativna. U četiri uzorka u kojima je citološki bila dokazana babezija nije potvrđena PCR-om. Mogući razlozi su loša kvaliteta početnog materijala te inhibicija PCR-a. U uzorku 10-343 se sigurno može isključiti inhibicija jer je isti uzorak bio pozitivan na prisutnost protozoona *Hepatozoon canis*. Pri samom korištenju arhivskih uzoraka u molekularnim istraživanjima potrebno je koristiti odsječke DNK manjih dužina kako bi se povećala osjetljivost same reakcije. U istraživanju je korišten PCR protokol (560 pb) kojim se rutinski dokazuju babezije iz krvi i tkiva koja nisu fiksirana formalinom i uklopljena u parafinske blokove, čime se može objasniti negativan nalaz PCR-om, a pozitivan citološkom pretragom.

Protutijela na bakteriju *Leptospira interrogans* dokazana su u četiri od devet uzoraka krvi iz srca dok su kulturelno i PCR-om isti uzorci bili negativni. Ovaj nalaz može se objasniti činjenicom da su svi psi bili liječeni zbog čega uzročnik nije neposredno dokazan već samo protutijela. Kada životinja ugine u subakutnoj fazi leptospire su prisutne jedino u proksimalnim tubulima bubrega i genitalnom traktu (VALLI i sur., 2007), a kako su pretraživane slezene, jasno je zašto su molekularne pretrage bile negativne. PCR protokolom korištenim u ovom istraživanju umnažan je DNK odsječak veličine oko 262 parova baza, što je pogodno za analize iz arhivskih uzoraka. Osjetljivost PCR metode mogla bi biti veća kada bi se DNK za analize izolirala iz tkiva bubrega.

Posebno je značajan nalaz protozoona *Hepatozoon canis* koji je dokazan u dva uzorka PCR metodom. Ovaj parazit dokazan je u gotovo 11% pasa u svim dijelovima Republike Hrvatske (VOJTA i sur., 2009.) te u više od 30% lisica (DEŽDEK i sur., 2010.), što ga čini jednim od najučestalijih parazita koji se prenosi vektorima i može uzrokovati anemiju pasa. Uzročnik je dokazan istovremeno sa babezijom u dva uzorka što je posebno zanimljivo jer koriste različite vrste krpelja kao vektore i različite načine invazije. *Hepatozoon canis* prenosi se krpeljem *Rhipicephalus sanguineus* i to na način da krpelj sa invazijskim stadijem mora biti pojeden, dok se *B. canis* prenosi ubodom krpelja *Dermacentor reticulatus*. Ovaj nalaz predstavlja prvi dokaz da se *H. canis* treba uzeti u obzir u postavljanju dijagnoze hemolitičke anemije kao samostalni uzročnik i kao mogući čimbenik kompliciranja babezioze.

Premda i rikecije (*A. phagocytophilum*, *E. canis*, *Rickettsia sp.*) mogu uzrokovati hemolitičke anemije, u ovom istraživanju nisu dokazane, kao ni bakterije iz roda *Bartonella*. Negativni rezultati ovih pretraga ne isključuju mogućnost pojedinačne i istovremene infekcije i ovim uzročnicima u istraživanju. Za dokazivanje ovih uzročnika također je korišten PCR protokol kojim se rutinski *A. phagocytophilum*, *E. canis*, i *Rickettsia sp.* dokazuju iz uzoraka periferne krvi.

Patoanatomska obilježja akutne leptospiroze i babezioze istovjetna su u nizu morfoloških nalaza koja uključuju ikterus, splenomegaliju, hepatomegaliju, hemoglobinuričnu i bilirubinuričnu nefrozu, mononekluarne nefritis, vaskulitis, diseminiranu intravaskularnu koagulopatiju, krvarenja, miokarditis i edem pluća (BANNETH, 2011.). U našem istraživanju provedenom na 20 pasa potvrdili smo da je lako dijagnosticirati hemolitičku krizu i njene posljedice ali je vrlo teško odrediti etiološkog uzročnika. Pregledom i klasifikacijom patoanatomskih lezija u istraživanju hemolitičkih anemija pasa nismo utvrdili lezije dovoljno specifične koje bi se mogle pripisati pojedinom uzročniku. I protozooni i bakterije uzrokuju klinički vrlo ujednačenu sliku koja se očituje i na sam patoanatomski nalaz. Morfološke lezije hemolitičkih anemija su upečatljive i jedinstvene, ali iz nalaza ikterusa, splenomegalije, hepatomegalije, petehija, edema i tromboza nije moguće zaključiti da li je intravaskularnu i ekstravaskularnu hematomolizu uzrokovao protozoon, bakterija ili autoimunosna reakcija. Truležni i autolitični procesi koji se odvijaju u lešinama umanjuju mogućnost citološkog dokazivanja uzročnika - protozoona, jer dolazi do postmortalnog raspadanja stanica. Također se zbog denaturacije proteina krvne plazme i proliferacije truležnih bakterija umanjuje postmortalna serološka detekcija protutijela na leptospire.

Primjena antibiotika u simptomatskom liječenju uginulih pasa također umanjuje i onemogućava uzgoj leptospira iz bubrega i drugih tkiva. Nije poznat utjecaj terapije imizolom na postmortalnu održivost protozoona babezija u eritrocitima stoga negativan citološki nalaz ne znači nužno da životinja nije uginula od babezioze. Sve navedeno upućuje da je molekularna tipizacija ključna za preciznu etiološku postmortalnu dijagnostiku. Poznavanje patogeneze i razvojnih ciklusa *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *Rickettsia sp.*, *Hepatozoon sp.*, *Babesia canis* i *Leptospira interrogans* omogućava odabir ciljnih organa za molekularnu i histopatološku detekciju. Stoga je najvažniji rezultat u ovom istraživanju potvrda istovremene infekcije babezijom i hepatozonom te jednak nalaz miokarditisa, nekroza i tromboza isključivo u srcu dva psa s ovom etiologijom. Kako u ostalim slučajevima babezioze nismo dokazali miokarditis nameće se pitanje da li *Hepatozoon canis* izaziva promjene na miokardu, a ne babezioza kako je opisana u literaturi (VALLI i sur., 2007.). U preciznijoj postmortalnoj dijagnostici hemolitičke krize neophodan je obdukcijski protokol kojim će u patohistološku pretragu uključeni skeletna, srčana i glatka muskulatura probavnog trakta, jer su to organi koje invadira *Hepatozoon canis* (BANNETH, 2011.). U Republici Hrvatskoj je dokazana invazija asimptomatskih pasa *Hepatozoonom canis* (BECK i sur., 2009). S obzirom da ovaj uzročnik tvori ciste u skeletnoj, srčanoj i glatkoj muskulaturi koje mogu mirovati dugo vremena i bez uzrokovanja kliničkih znakova čini se da babezioza i drugi uzročnici hipoksičnih stanja mogu aktivirati ciste i osloboditi merozoite sa posljedičnim masivnim nekrozama miokarda kao što smo pokazali u slučaju psa 09-465 i 10-343. Iz svega navedenog vidljivo je da je nužna promjena obdukcijskog protokola u hemolitičkim anemijama pasa. Osim patoanatomskog i histopatološkog pregleda potkožja, slezene, jetre, srca, pluća i bubrega, nužno je uzorkovati ranije navedena mišićna tkiva te izraditi citološke otiske istih. Smrzavanje svježih uzoraka tkiva neophodno je za molekularnu etiološku dijagnostiku.

ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju arhivskih uzoraka patoanatomskim, histopatološkim, citološkim, serološkim i molekularnim metodama dokazani su očekivani uzročnici hemolitičke anemije poput protozoona *Babesia canis* i bakterije *Leptospira interrogans*, dok je po prvi puta u uginulih pasa dokazan protozoon *Hepatozoon canis*. Kako su uzročnici dokazani različitim dijagnostičkim metodama razvidna je nužnost istovremene primjene više metoda za postavljanje etiološke dijagnoze.

Temeljem dobivenih patoanatomskih i histopatoloških rezultata nije bilo moguće naći karakterističan nalaz za pojedine patogene uzročnike. Isto tako, nije bilo razlika u nalazima uzoraka u kojima su bili dokazani uzročnici jednom od opisanih metoda i uzoraka u kojima nisu bili dokazani uzročnici.

Miokarditis je bio dokazan jedino u uzorcima sa istovremenom invazijom uzročnicima *B. canis* i *H. canis*. Ovaj nalaz je posebice važan jer ukazuju na nužnost primjene složenije dijagnostike kod komplicirane babezioze pasa i određivanje optimalnog protokola liječenja.

Nužna je promjena standardnih protokola uzorkovanja organa i tkiva u pasa uginulih od hemolitičke anemije posebice zbog nalaza protozoona *H. canis*, kao i optimalizacija protokola PCR-a za analizu arhivskih uzoraka.

POPIS LITERATURE

1. BANETH G. (2011): Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary parasitology* 181, 3-11.
2. BECK R., L. VOJTA, V. MRLJAK, A. MARINCULIĆ, A. BECK, T. ŽIVIČNJAK, S. M. CACCIO (2009): Diversity of Babesia and Theileria species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology* 39, 843-848.
3. BRANGER C., B. BLANCHARD, C. FILLONNEAU, I. SUARD, F. AVIAT, B. CHEVALLIER, G. ANDRÉ-FONTAINE (2005): Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic Leptospira based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett.* 243, 437-45.
4. BROWN C. C., D. C. BAKER, I. K. BARKER (2007): Alimentary System u Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals, ed Maxie M. G. , 5th ed., vol. 3, PP. 239-243. Elsevier, Philadelphia, PA.
5. BROWN G. K., A. R. MARTIN, T. K. ROBERTS and R. J. AITKEN (2001): Detection of Ehrlichia platys in dogs in Australia. *Aust.Vet. J.* 79, 554- 558.
6. CHAN P. K. S., D. P. C. CHAN, K-F TO, M. Y. YU, J. L. K. CHEUNG, A. F. CHENG (2001): Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J. Clin. Pathol.* 54.401-403.
7. CHOMEL B. (2011): Tick-borne infections in dogs-an emerging infectious threat. *Vet Parasitol.* 179, 294-301
8. CORAL GARCIA. E., H. GIL, M. RODRIGUEZ - VARGAS, X. GERIKAGOITIA, J. BARANDIKA, R. ESCUDERO, I. JADO, C. GARCIA - AMIL, M. BARRAL, A. L. GARCIA - PEREZ, M. Bhide, P. ANDA (2008): Molecular Method for Bartonella Species Identification in Clinical and Environmental Samples. *Journal Of Clinical Microbiology.* 46, 776–779.
9. DEŽDEK, D., L. VOJTA, S. ĆURKOVIĆ, Z. LIPEJ, Ž. MIHALJEVIĆ, Ž. CVETNIĆ, R. BECK 2010: Molecular detection of Theileria annae and Hepatozoon canis in foxes (Vulpes vulpes) in Croatia. *Veterinary parasitology* 172 ; 333-336.

10. EWING S. A., R. J. PANCIERA (2003): American canine hepatozoon. *Clinical Microbiology Reviews*. 16, 688-697.
11. FRY M. M., M. D. McGAVIN (2012): Bone marrow, blood cells and lymphatic system u Zachary J. F., M. D. McGavin: *Patologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed., St. Louis, MO: Elsevier; 721-1.
12. GUPTILL L. (2010): Bartonellosis. *Vet Microbiol*. 140, 347-59.
13. INOKUMA H., M. OKUDA, K. OHNO, K. SHIMODA, T. ONISHI (2002): Short communication analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology* 106, 265–271.
14. IRWIN P. J. (2009): Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control from International Canine Vector-Borne Disease Symposium. *BioMed Central*, 2 (Suppl 1): S4, Seville, Spain.
15. KELLY P. J., C. XU, H. LUCAS, A. LOFTIS, J. ABETE, F. ZEOLI, A. STEVENS, K. JAEGERSEN, K. ACKERSON, A. GESSNER, B. KALTENBOECK, C. WANG (2013): Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St. Kitts, West Indies. *Plos One*, 8, e53450. doi:10.1371/journal.pone.0053450
16. OHAD D.G., D. MORICK, B. AVIDOR, S. HARRUS (2010): Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella koehlerae* from aortic valves of Boxer dogs with infective endocarditis. *Vet Microbiol*. 141, 182-5.
17. RISHNIW M., S. C. BARR, K. V. SIMPSON, M. F. FRONGILLO, M. FRANZ, J. L. DOMINGUEZ ALPIZAR (2006): Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*. 135, 303-14.
18. SHAW S. E., M. J. DAY, R. J. BIRTLES, E. B. BREITSCHWERDT (2001): Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in parasitology*. 17, 74- 80
19. VALLI V. E. O. (2007): Hematopoetic system u Jubb, Kennedy and Palmer's *Pathology of domestic animals*, ed Maxie M. G., 5th ed., vol. 3, Elsevier, Philladelphia, PA.

20. VOJTA, L., V. MRLJAK, S. ĆURKOVIĆ, T. ŽIVIČNJAK, A. MARINCULIĆ, R. BECK (2009): Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. *International journal for parasitology*. 39, 1129-1136.

SAŽETAK

MAJA ANTOLIĆ

ŽELJKA ANZULović

MOLEKULARNA ETIOLOŠKA RETROSPEKTIVNA STUDIJA INFEKCIOSNIH HEMOLITIČKIH ANEMIJA PASA

Hemolitička anemija nastaje kada udio razorenih crvenih krvnih zrnaca brojčano nadmaši broj novostvorenih. Uzroci mogu biti različiti, a očituju se karakterističnim patoanatomskim i histopatološkim nalazom kojim dominira ikterus, splenomegalija, hepatomegalija i hemoglobinurična nefroza. Najčešći infektivni uzročnici hemolitičke anemije pasa u Republici Hrvatskoj su protozoon *Babesia canis* (*B. canis canis*) i bakterija *Leptospira interrogans*, stoga je cilj rada istražiti sudjeluju li u nastanku hemolitičke anemije drugi uzročnici te postoji li specifičan histopatološki i patoanatomski nalaz za pojedinog uzročnika. U radu su pretraženi izabrani arhivski uzorci sa nalazom hemolitičke anemije prijemjenom molekularnih, citoloških, seroloških, histopatoloških i patoanatomskih metoda. Dokazano je da su najučestaliji uzročnici bili protozoon *B. canis* i bakterija *Leptospira interrogans* dok je po prvi puta dokazan u uginlih pasa protozoon *Hepatozoon canis* u dva uzorka. Temeljem patoanatomskih i histopatoloških nalaza nije bilo moguće razlikovati invazije protozoonom *B. canis* od infekcija bakterijom *L. interrogans*. Također nije postojala razlika između nalaza sa dokazanim uzročnicima i onima u kojima nisu dokazani. Miokarditis je bio dokazan jedino u uzorcima sa istovremenom invazijom protozooma *B. canis* i *H. canis*. Budući da nisu dokazani specifični histopatološki i patoanatomski nalazi, a druge metode korištine u ovom istraživanju nisu pokazale jedinstven nalaz, razvidna je nužnost istovremene primjene više različitih metoda i prilagođavanje protokola pretraga kako bi se postavila etiološka dijagnoza.

Ključne riječi: hemolitička anemija, pas, retrospektivna studija, arhivski uzorci, PCR, etiologija

SUMMARY

MAJA ANTOLIĆ

ŽELJKA ANZULović

MOLECULAR ETIOLOGICAL RETROSPECTIVE STUDY OF CANINE INFECTIOUS HEMOLYTIC ANEMIAS

Haemolytic anaemia occurs when the number of damaged red blood cells exceeds the number of produced. The causes can be varied, and are reflected with characteristic pathological and histopathology findings dominated by icterus, splenomegaly, hepatomegaly, and haemoglobinuric nephrosis. The most common infectious agents causing haemolytic anaemia in dogs in Croatia are protist *Babesia canis* (*B. canis canis*) and bacteria *Leptospira interrogans*, therefore the aim of the study is to investigate whether other pathogens are involved in the development of haemolytic anaemia and if there are specific histopathology and pathoanatomical finding exist for each pathogen. In the current research archival samples with the confirmed haemolytic anaemia were selected and examined with molecular, cytological, serological, histopathology and pathoanatomical methods. It has been shown that the most common pathogens were *B. canis* and *Leptospira interrogans* while for the first time protist *Hepatozoon canis* was demonstrated in the two histological samples. Based on path anatomical and histopathology findings it was not possible to distinguish between the invasion with *B. canis* and infection with *L. interrogans*. There was also lack of difference between the findings in samples with confirmed pathogens and in those where pathogens have not been proven. Myocarditis was detected only in samples with a simultaneous invasion with *B. canis* and *H. canis*. Since the absence of specific pathoanatomical and histopathology findings and other methods used in this study did not show a unique finding, those results have shown the necessity of simultaneous application of multiple methods and optimisation of protocols to detect causative agents of haemolytic anaemia.

Key words: hemolytic anemia, dog, retrospective study, archival samples, PCR, etiology