

Investigation of microfilariae of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by light microscope

Part 1: Recognition of microfilariae in different samples

Majoros Gábor*
Juhász Alexandra

G. Majoros*
A. Juhász

SZIE ÁOTK Parazitológiai
és Állattani Tanszék
H-1078 Budapest, István u. 2.

*e-mail: majoros.gabor@aotk.szie.hu

A *Dirofilaria immitis* és *Dirofilaria repens* mikrofiláriák fénymikroszkópos vizsgálata

1. rész: A mikrofiláriák felismerése a különféle mintákban

PARAZITOLÓGIA

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők *Dirofilaria immitis* és *Dirofilaria repens* fonálférgék okozta mikrofilariaemia felismeréséhez és a mikrofiláriák (embrionális lárvák) azonosításához ajánlanak könnyen kivitelezhető módszereket a kisállatpraxissal rendelkező állatorvosok számára. A cikkben bemutatott egyszerű fénymikroszkópos technikák abban segítenek, hogy lehetőleg minél több szubklinikai fertőzöttséget lehessen felismerni, nemcsak az élő állatokban, hanem az elhullottakban is. Mivel mozgó lényeket a vérben könnyebb észrevenni, mint mozdulatlan objektumokat, a mikrofiláriák megtalálását elősegíti, ha a vért olyan módon hemolizáljuk, amely nem öli meg azokat. Ezért a hagyományos Knott-féle módszer helyett a hemolízishez nátrium-lauril-szulfátot (SDS) ajánlanak, a mikrofiláriák jobb láthatósága érdekében pedig az élő és elhalt férgeket is megfestő níluskék festéket. Az állati tetemek megalvadt vérében is könnyen megtalálhatók a mikrofiláriák, ha az alvadékat bázikus szövettani festékek (pl. metilénkék vagy níluskék) oldatában áztatjuk, majd tárgylemezen szétnyomjuk.

SUMMARY

The authors suggest easy methods for veterinarians with small animal practice to detect the presence of microfilariae produced by *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* nematodes and to recognize their embryonic larvae (prelarvae). The presented simple light microscopy techniques help to reveal as many subclinical infections as possible, and not only in living animal, but also in carcasses of dead ones. As the actively moving creatures in blood can be detected easier than motionless ones, the finding of the microfilariae is promoted by using such way of haemolysis that does not kill them. Instead of the traditional Knott's method therefore, they suggest to use sodium lauryl sulphate for haemolysis and Nile blue for staining living and dead microfilariae both in order to see them better. Clotted blood of the dead animals can be investigated easily for microfilariae if a bit of clot is immersed into a dark solution of alkaline histological dye (i.e. methylene or Nile blue) then it is pressed apart on microscopic slide.

Az utóbbi években mind a magyarországi állatorvosi közvéleményt, mind a társ-állatok gazdáit foglalkoztatja a kutyák – és esetenként más állatok – filarioida férgekkel való fertőzöttsége, részben azok zoonotikus jelentősége miatt is (2, 9, 10, 11, 12). A kilencvenes évek óta a kutyafélék jobb szívfelében élősködő *D. immitis* és a kötőszövetben élő *D. repens* fonálférgeket egyre gyakrabban mutatják ki a klinikai vizsgálatok alkalmával, ill. *post mortem* is (3, 6). Noha csípőszúnyog vektorok közvetítésével mindkét féregfajnak lehet *accidentalis* gazdája az ember, és a kutyákban vegyes fertőzöttség is előfordulhat, a gyógykezelés és a kórjóslat szempontjából határozott jelentősége van annak, hogy e két fajt a *dirofilariosis* felismerésekor elkülönítsük egymástól. Míg a boncolás során talált vagy a műtéttel eltávolított, kifejlett férgek meghatározása rendszerint nem okoz gondot, a vérben keringő embrionális lárváik alapján való felismerésük és elkülönítésük nehezebb.

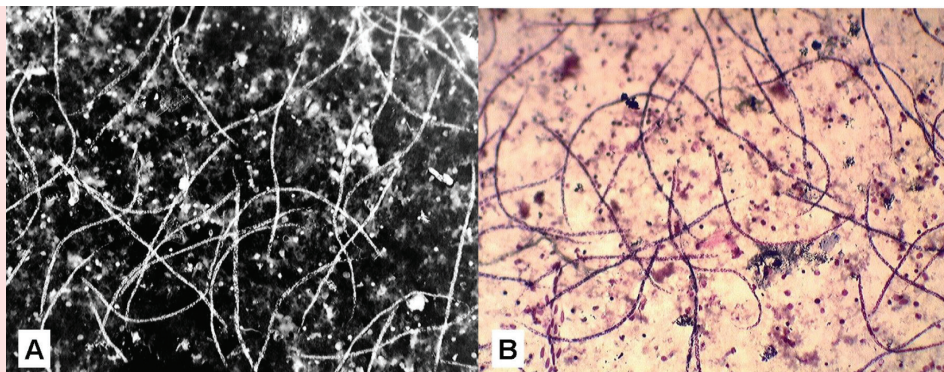
A gyógykezelés és a kórjóslat szempontjából fontos megkülönböztetni a *D. repens* és a *D. immitis* fertőzöttséget

Az elevenszülő fonálféreg az embrionális állapotú lárváikat, az ún. mikrofiláriákat a szövetközi folyadékba vagy közvetlenül a vérbe juttatják

A mikrofilariaemia önmagában is bizonyítja a gazda fertőzőképességét, ezért azt mindenképpen kezelni kell

Az extraintestinalisan élősködő, *Filariidae* családba tartozó, elevenszülő fonálféreg az embrionális állapotú lárváikat, az ún. mikrofiláriákat a szövetközi folyadékba vagy közvetlenül a vérbe juttatják. (A továbbiakban a „lárva” és „mikrofilária” szavakat szinonimaként használjuk!) A mikrofiláriák a megszületésük után hónapokig élnek a vérben és a nyirokban (7). Ezért jóval a kifejlett nőtény férgek természetes vagy állatorvosi beavatkozás nyomán bekövetkező elpusztulása, ill. eltávolítása után is találhatunk ilyen lárvákat a perifériás vérben, amelyek fertőzőképesek maradhatnak még akkor is, ha esetleg az adult férgeket anthelmintikummal elpusztítottuk. A kutyákban diagnosztizált mikrofilariaemia tehát nem minden esetben bizonyítja, hogy a gazdában éppen élő, kifejlett *Dirofilaria* nőtények vannak (2), de ettől függetlenül bizonyítja a gazda potenciális fertőzőképességét más gazdára nézve, a szúnyogok mint biológiai vektorok segítségével. A férgeket és ezáltal a mikrofiláriákat is fenntartó kutyák rezervoárjai a kórokozónak, különösen azért, mert tünetmentes fertőzés esetén ez az állapot évekig fennállhat. A mikrofilariaemiát tehát mindenképpen kezelni kell, függetlenül attól, hogy a féregfertőzés okoz-e kóros tüneteket vagy nem, ill. a kifejlett férgeket a műtét során a gazdában megtaláltuk-e vagy sem.

Ideális esetben a vérben lévő lárvák mennyiségének változásából is következtethetünk



1. ÁBRA. Hemolizált vér üledékében aggregálódott *D. repens* mikrofiláriák

A: a nedves kenetben lévő, natív mikrofiláriák sötét látótérben;

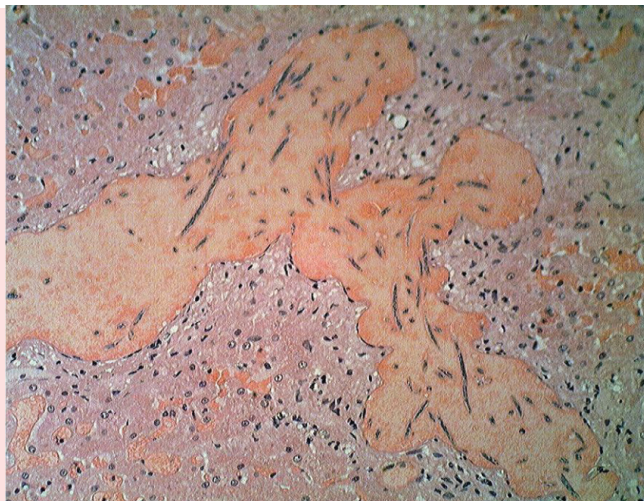
B: a fixált és megfestett kenetben lévő mikrofiláriák

200×

FIGURE 1. Aggregated microfilariae of *D. repens* in sediment of haemolysed blood

A: native microfilariae in a wet mount with dark field illumination;

B: microfilariae in fixed and stained smear



2. ÁBRA. A *D. repens* mikrofiláriáinak sötétre festődött metszetei a máj egy elágazó, kitágult, kis vénájában
H.-E., 200×

FIGURE 2. Dark sections of microfilariae of *D. repens* in a small branched and dilated vein of the liver

a *Dirofilariák* elleni gyógykezelés hatékonyságára, és ezt a változást még akkor is illik nyomon követni, ha magukat a férgeseket sebészeti úton távolítottuk el. Ennek egyik oka az, hogy meggyőződünk a gazda fertőzőképességének megszűnéséről, a másik ok pedig az, hogy soha nem lehetünk biztosak abban, hogy minden férget lokalizáltunk és elöltünk a gazdában. Figyelembe kell azonban venni, hogy a mikrofiláriák mennyisége nincs szoros összefüggésben a kifejlett férgek számával, mivel az nemcsak a fertőzöttség intenzitásától függ, hanem a hímek és nőstények arányától, a gravid férgek mennyiségétől, fejlettségétől és lokalizációjától is. Ennek ellenére, a nagyságrendekkel csökkenő lárvaszám megbízhatóan jelzi azok pusztulását. Természetesen a milliliterenkénti több száz féreglárvát jelenlétét már egyszerű vérkenetben is felfedezhetjük, akár natív – főleg sötét látóterés – mikroszkópos vizsgálattal (1/A ábra), akár szárítás és sejtfestés után (1/B ábra). Hasznos lenne azonban, hogy ha minél több gyakorló állatorvos fel tudná ismerni még az enyhe szintű mikrofilariaemiát is, amikor csak elvétve vannak lárvák a perifériás vérben. A kis mennyiségű mikrofilária kimutatása nem könnyű feladat, de éppen ennek van nagy jelentősége a fertőzés pátenssé válásának kezdetén, ill. a fertőzöttség megszűntének bizonyítása alkalmával. A továbbiakban néhány egyszerűbb laboratóriumi eljárást ajánlunk a mikrofilariaemia felismerésére, továbbá a *D. immitis* és *D. repens* lárvák elkülönítésére.

A MIKROFILÁRIÁK KIMUTATÁSA A KÜLÖNFÉLE MINTÁKBÓL

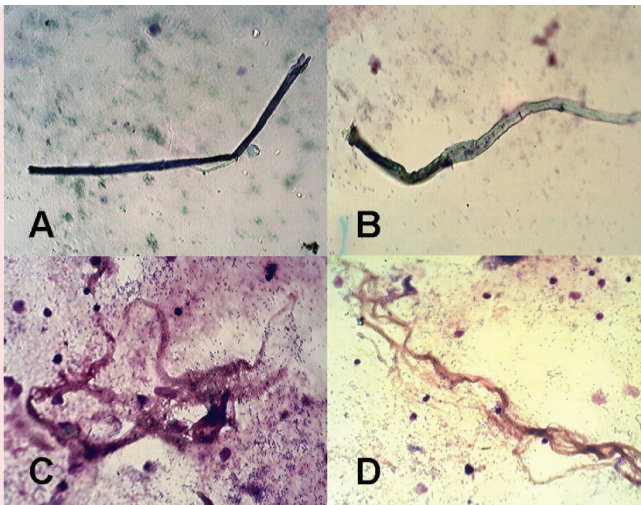
Hagyományos parazitológiai módszerekkel a vérben keringő mikrofiláriák a legcélszerűbben az alvadásban gátolt vérből mutathatók ki, de a *D. repens* esetében még a bőr alatti kötőszövetben tartózkodó nőivarú féreg környezetéből vett szövet folyadékban is megtalálhatók. E lehetőségeken felül igény merülhet fel arra, hogy az elhullott állatból mutassuk ki a mikrofiláriákat, hiszen a boncolás során – különösen, ha nem számítunk az előfordulásukra – nem feltétlenül találjuk meg a szövetek közé rejtőzött férgeseket, vagy olykor csak az állat egyes szerveinek vizsgálatára van módunk. Kivételes esetben a rutin szövettani metszetekben is felfedezhetjük a kifejlett férgek vagy lárváik jelenlétét (2. ábra), de ez ritkán fordul elő. A patológiai vizsgálat alkalmával, ha a hullából savót tudunk nyerni, akkor abban egyszerű ülepítéssel is megtalálhatjuk a lárvákat. Ellenkező esetben a véralvadékból kell azokat kimutatni.

A MIKROFILÁRIÁK KIMUTATÁSA ÉLŐ ÁLLAT VÉRÉBŐL

A hemolízisen alapuló morfológiai eljárások alapvetően a folyékony halmazállapotú vér vizsgálatán alapulnak, ami lehet friss avagy alvadásában gátolt vér. A legismertebb, Knott-féle módszer alkalmazása során híg formaldehid-oldatot használnak a hemolízisre és egyúttal a lárvák fixálására is, azért, hogy majd megfesthessék azokat metilénkékekkel a jobb láthatóság érdekében (1, 7, 8). E módszernek az a hátránya, hogy megöli a lárvákat, és ezért azok mozdulatlan, merev pálcák vagy girbegurba szálak formájában kerülnek a mikroszkóp lencséje

A keringő mikrofiláriák alvadásban gátolt vérből mutathatók ki leginkább

A formaldehid-oldatot használó Knott-módszer hátránya, hogy elpusztítja a lárvákat



3. ÁBRA. Mikrofiláriához hasonló műtermékek a hemolizált vérben

- A:** metilénkékkel festődött növényi rost a hemolizátum nedves kenetében;
B: níluskékkel színeződött textilrost a hemolizátum nedves kenetében;
C és D: fehérjekoagulátumok az üledék Giemsa-festéssel megfestett kenetében
 Níluskék-festés, 200×

FIGURE 3. Artifacts in haemolysed blood are reminiscent of microfilariae

- A:** plant fibre stained with methylene blue in a wet mount of haemolysed blood;
B: Nile blue coloured textile fibre in a wet mount of haemolysed blood;
C and D: protein coagulates in the Giemsa stained smear of sediment

A hemolízishez leginkább a nátrium-lauril-szulfát ajánlható, ami életben hagyja a lárvákat és további vizsgálatokat is lehetővé tesz

alá, ami a felismerésüket megnehezíti. A vérmintába véletlenül belekerülő, élettelen textilrostok, pehelyszőrök, kicsapódó fehérjeszálak a mikrofiláriához hasonló alakúak és festődésűek lehetnek, és ilyen körülmények között esetleg összetéveszthetők azokkal (3. ábra). Tanszékünkön a formalin helyett szaponin vagy akármely semleges kémhatású háztartási mosogatószer híg (kb. 2–3%-os) oldatának néhány cseppjét és a vér térfogatánál legalább ötször több desztillált vizet használtunk a vér hemolizálásához. A lárvák egyidejű megfestéséhez a hemolizátumba 0,1–0,2 ml (tíz milliliterenként néhány csepp) 10%-os níluskék-szulfát-oldatot teszünk. Az általunk használt „módosított Knott-féle módszernek” nevezett eljárás során a lárvák életben maradnak, és ezzel a szupravitalis festékekkel kellően meg is színeződnek (6). Ha az így kezelt vér üledékét vizsgáljuk a mikroszkópban, a lárvák mozgása nemcsak az észrevehetőségüket növeli, hanem a műtermékekkel szemben, egyértelművé teszi féreg mivoltukat is.

Tökéletes hemolízist érhetünk el, ha a vér és a desztillált víz 1 : 20 arányú keverékébe a nagyon erős detergens hatású, gyógyszertárakban is beszerezhető nátrium-lauril-szulfát (vagy a kémiailag tiszta Na-dodecilszulfát, SDS) 1%-os oldatának 1–2 milliliternyi mennyiségét tesszük bele, mert ekkor nemcsak az összes sejthártya, hanem még a legtöbb sejtmag is feloldódik, és csak a kutikulával burkolt mikrofiláriák maradnak épen (4. ábra). Ennek az eljárásnak az eredeti Knott-módszernél jóval nagyobb érzékenysége van, mert a lárvák éles kontúrja nagyon könnyen észrevehető a zavaró objektumok nélküli háttér előtt, és emiatt nagyon kevés lárva felismerésére is alkalmas. A níluskék a javasolt mennyiségben a vér és víz keverékét feketésvörösre színezi, és nemcsak az élő, hanem az elhalt lárvákat is megfesti, tehát olyan állott, régebbi vérminta vizsgálatára is alkalmas, amelyben már a lárvák elpusztultak. A baktériumölő hatású SDS még a baktériumos rothadás esetén is észlelhetővé teszi a

vérben lévő mikrofiláriákat, ezért a segítségével a bomló hullákból is kimutatható a *Dirofilaria*-fertőzöttség (5. ábra). A javasolt módszerrel kezelt vérből koncentráltan kigyűjtött mikrofiláriák nukleinsava alkalmas molekuláris vizsgálatokra is, ami nem mondható el a formalinos hemolízissel gyűjtött lárvákról. A hemolizált és festékekkel összekevert vért általában asztali centrifugában, kis fordulatszámra, 1–2 percig kell ülepíteni, de a lárvák viszonylag nagy fajsúlya miatt azok maguktól is – akár egy fél órán belül – centrifugálás nélkül leülepednek a keverék aljára. Utóbbi esetben az üledék kevesebb zavaró objektumot tartalmaz.

Az itt javasolt módszer nem igényel nagy precizitást, mert sem a vérsejtoldó anyagokat, sem a festéket nem lehet szándékolatlanul túladagolni. A vér térfogatánál legalább egy nagyságrenddel több desztillált víz éppenséggel elősegíti a lárvák gyors ülepedését, a sejtekhez kötődő szupravitalis festék pedig úgyis csak olyan mértékben festi meg az élő vagy holt lárvákat, ahogyan azt azok sejtjei felvenni képesek. A vért 10–20-szorosára is hígíthatjuk desztillált vízzel (vagy annak hiányában felforralt és lehűtött, tiszta csapvízzel), majd a sejtmembránok szétmálasztása érdekében hozzácseppentjük a detergens-oldat cseppjeit, és habképződés nélkül, óvatosan összekeverjük azzal. (A forralással nem lágyított, kezeletlen



4. ÁBRA. *D. repens* mikrofiláriái nátrium-lauril-szulfáttal hemolizált és níluskékkel festett vér vizes üledékében
Níluskék-festés, 500×

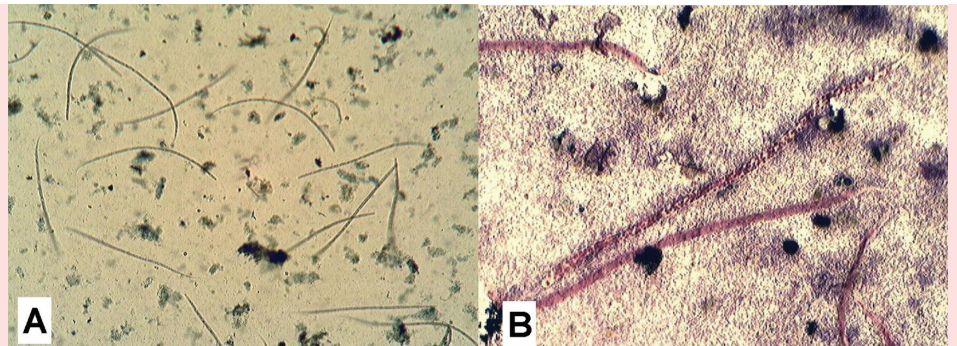
FIGURE 4. *Microfilariae* of *D. repens* in wet mount of blood that haemolysed with sodium-lauryl-sulphate and stained with Nile blue

Nagytestű állatok esetében az alapos vizsgálathoz akár 10–20 ml vér hemolízise is szükséges

csapvíz is használható hemolizálásra, de karbonátok csapódhatnak ki belőle, ami zavarossá teheti az üledéket.) Több centrifugacsőbe is szétszthatjuk a hemolizátumot. Ajánlatos nem szögrotoros, hanem kilendülő rotoros centrifugát használni, mert ez utóbbi esetben nem a cső aljának oldalára, hanem a cső fenekének közepére ülepednek ki a lárvák, mivel a centrifugális erő mindig a cső hossz tengelyének irányába hat. Ha nem kell sietnünk a vizsgálattal, kúp alakú ülepítő pohárban is előidézhetjük a hemolízist, és fél, de legfeljebb egy óra eltelte után, annak aljáról szippantjuk fel a lárvákat. Ez a módszer főleg több milliliternyi vér hemolízise esetén ajánlott, de kis mennyiségű vért is feldolgozhatunk így, mert minél jobban hígítjuk a vért, a hemolizátum sűrűsége annál kisebb, s emiatt a lárvák annál gyorsabban ülepednek benne. A spontán leülepedett lárvák körül kevesebb zavaró sejttörmelék gyűlik össze, mint a centrifugálással leültetett mikrofiláriák körül.

Ha közvetlenül a véna megszúrásakor azonnal desztillált vízzel telt csőbe vesszük a vért, akkor azt alvadésgátló anyagok alkalmazása nélkül is hemolizálhatjuk. Általában Na-, K-EDTA-val vagy Na-citráttal dekalcinált, esetleg heparinos vérmintát érdemes vizsgálni, amelyet erre a célra szolgáló vérvételi csőben fogunk fel. Minél nagyobb mennyiségű vér hemolízisére van mód, annál több esélyünk van meg-

találni a lárvákat, ezért ne csak egy-két csepp vért vegyünk, hanem lehetőleg több millilitert, az állat testnagyságától és egészségi állapotától függően. Törekedjünk arra, hogy legalább 3-4 ml vért tudjunk venni, de az alapos vizsgálathoz, nagytestű állat esetén akár 10-20 ml vér hemolízise és vizsgálata is szükséges lehet. A diurná-



5. ÁBRA. *D. repens* mikrofiláriák egy elhullott kutyából származó, nátrium-lauril-szulfáttal hemolizált, baktériumokat tartalmazó vérben

A: níluskékkel festett mikrofiláriák a vizes szuszpenzióban az összecsapódott baktériumkolóniák között, 200×;

B: Giemzával festett mikrofiláriák és baktériumok az üledékből készített, fixált kenetben, 500×

FIGURE 5. *D. repens* microfilariae in the sodium lauryl sulphate haemolysed blood containing bacteria from a carcass of a dog

A: Nile blue stained microfilariae among aggregated bacterial colonies;

B: microfilariae and bacteria in the fixed smear of the sediment stained with Giemsa



6. ÁBRA. Élő állapotban fixált *D. immitis* mikrofilaria a hemolizált vér üledékének kenetében (két lymphocytasejtmag mellett)

Giemsa-festés, 700×

FIGURE 6. *D. immitis microfilaria* preserved while alive within the smear of sediment of haemolysed blood (in addition to the two lymphocyte-nuclei)



7. ÁBRA. Élő állapotban tárgylemezre fixált *D. repens* mikrofilaria a hemolizált vér üledékének kenetében (a mintába került textilrost mellett)

Giemsa-festés, 800×

FIGURE 7. *D. repens microfilaria* preserved to slide while alive within the smear of sediment of haemolysed blood (in addition to a textile fiber in the sample)

A tárgylemezre szélesztett üledéket a mikroszkópos vizsgálat után rá is lehet szárítani a lemezre, majd fixálás után megfesteni további elemzés céljából

lis ritmust követő lárvasűrűség az esti órákban éri el a maximumát, és napközben a minimumon van, ezért a vizsgálathoz az optimális vérvétel ideje az esti, esetleg a hajnali órákban van – különösen, ha enyhe szintű a mikrofilariaemia (5).

A vérsjeltoldódás után kapott üledéket hegyes pipettával egymás után több tárgylemezre, kis cseppekben ajánlott kicseppenteni, hogy azt minél vékonyabb rétegben tudjuk szétteríteni az üvegen. A tárgylemezre szélesztett üledéket, annak azonnali mikroszkópos vizsgálatát követően rá is száríthatjuk a lemezre, majd azután 70%-os alkohollal leöntve fixálhatjuk is. Ezután lehet megfesteni a lárvákat szövettani festékekkel, például Giemsa-oldattal vagy akármely komplexebb hematológiai festőeljárással. Optimális festést eredményez a May-Grünwald-oldattal és Giemsa-oldattal végzett teljes Pappenheim-féle festés (4). Ezekkel a festési eljárásokkal feltűntethetjük a lárvák sejtes szerkezetét – mindamellett megfesthetjük, és így felismerhetjük a kenetben esetleg jelen lévő vérprotozoonokat is. (Pl. a babesiák páros merozoitái és egyéb piroplazmák is jól koncentrálnak a vérből ezzel a módszerrel, bár ilyen esetben a felismerésük a gyakorlatlan szem számára körülményes, mivel nem a sejten belül, hanem a sejtek szétesése miatt azokból kiszabadulva láthatók.)

Ha nem a sejtmembránokat feloldó SDS-t használunk a sejtes elemek feloldására, a hemolízis után a fehérvérsejtek sejtmagjai, a vérlemezkék maradványai, a vörösvérsejtek sejthártyái és minden egyéb korpuszkuláris elem együtt ülepedik le a lárvákkal. Akármilyen óvatosan és tisztán vesszük le a vért, az ahhoz nem tartozó idegen elemeket, például hámsejteket, szőrszálakat, textilrostokat és a bőrön élő mikroorganizmusokat gyakran találhatunk a vérvizsgálat közben. (Egészen kivételes esetben, a vérben keringő orsóféreg (*Toxocara*), kampósféreg (*Ancylostoma*) vagy más férgek lárváira is akadhatunk, de azok jóval robosztusabbak a mikrofilariaéknál, továbbá nyelőcsőre, ill. éles határu sejtekből álló bélre tagolt emésztőcsövük van, ezért könnyen megkülönböztethetők a filarioid férgek lárváitól.)

Az élő mikrofiláriák rángatózva mozognak a folyadékban, a tárgylemez felületén pedig kígyószerű mozgással haladnak. Emiatt ha ép, élő lárvákat szárítunk rá az üvegre, azok teste hullámvonalas alakban rögzül (6. és 7. ábra). Az órákig állott vérplazmában elpusztult lárvák teste viszont megbénul, és hajlatai elsimulnak a folyadékban, ezért ha már elhalt példányokat szárítunk és rögzítünk rá a tárgylemezre, azok ívben meghajolva, olykor pedig megtört vagy egyenes pálca formájában láthatók a mikroszkópban (ld. 1. és 5. ábra). A lárvák hosszmeretének vizsgálatához ez az utóbbi testtartás előnyös, és kinyúlt testtartásban rögzítve jobban látszanak a szövettani festékekkel festett sejtjeik is. Ezért az élő lárvákat a tárgylemezen nagyon vékony folyadékrétegben terítsük szét, és azt 3–4-szer láng fölött húzzuk keresztül, a bakteriológiai festéseknél alkalmazott módon. Így a lárvák kiegyenesedve pusztulnak el, s ezt az alakot a lemezre való szárítás után is megőrzi. A tárgylemezen lévő lárvákat ez esetben is 70%-os metanollal vagy etanollal rögzítsük az üvegre a festés előtt.

A MIKROFILÁRIÁK KIMUTATÁSA AZ ELHULLOTT ÁLLATOK VÉRÉBŐL

Az elhullott állatokban rendszerint már csak az elpusztult lárvákat találjuk meg, mert ritkán kerül sor az elhullást követő, azonnali boncolásra. A gazda testében elpusztult lárvák a legkülönbözőbb alakot vehetik fel. Testük rendszerint megnyúlt állapotban bénul meg: többnyire ívesen hajlottak vagy megtörttek, olykor girbegurba alakzatban merevednek meg, de sohasem hullámos testtartásban. Hajlamosak kusza halmazokba tömörülni az alvadó vérben. Az autolízis és a baktériumos bomlás hatásának ideig-óráig ellenáll a kutikulájuk, ezért amíg a hullában vörös színű a vér, abban jól kimutathatók.

A vér alvadása után szinte az összes mikrofilária az alvadékba kerül, és a savóban alig marad belőlük néhány. Ennek ellenére, ha a boncoláskor savót tudunk nyerni a szívpitvarokból, érdemes azt vízzel felhígítani, és kémcsőben vagy kúp alakú ülepítő pohárban hagyni leülepedni, mert a lárvák a híg folyadékban gyorsan az üveg aljára süllyednek. Az üveg fenékre leülepedő lárvákat pipettával felszippantjuk, és a hemolizált vér üledékével azonos módon, tárgylemezre cseppentve vizsgáljuk. Annak ellenére, hogy a savóban csak gyér számú larva marad, közöttük hosszabb ideig lehet élő lárvát találni, mint az alvadéskor kicsapódó fibrinszálak között. Mivel az élő larva megtalálása sokkal könnyebb, mint az elpusztult larva felismerése, ajánlatos élni ezzel a lehetőséggel.

Magában az alvadékban, a vérlepenyben a mikrofiláriák gyorsan elpusztulnak, feltehetőleg oxigénhiány miatt. Megállapítottuk, hogy az alvadékcsomok perifériás részein a lárvák mindig kinyúlt állapotban vannak, ezzel szemben a vérlepeny belsejében, összezsugorodott állapotban megmerevedett lárvákkal is találkozhatunk. Sajnos a véravadékból akár mechanikai, akár kémiai úton nagyon nehéz kiszabadítani a mikrofiláriákat, mert ahogy vizsgálataink során tapasztalhattuk, minden egyszerűbb, proteolízist okozó eljárás (pl. lúgos feltárás, pepszines vagy tripszines emésztés stb.) roncsolja azokat. A lárvák kimutatásához azonban az alvadék szétfoszlatására nincs



8. ÁBRA. Metilénkékkel festett *D. repens* mikrofiláriák és fehérvérsejtmagok a vérlepenyben

Tárgylemezen, fedőlemez alatt szétnyomott véralvadék, 200×

FIGURE 8. *Microfilariae* of *D. repens* and nuclei of leukocytes stained by methylene blue in clot of blood
Crushed clot of blood on microscopic slide squeezed with cover slip

is feltétlenül szükség. Ha ugyanis az alvadék kis darabkáit vízben oldott, 10%-os metilénkék vagy níluskék oldatában áztatjuk egy-két óráig, a festék jól bediffundál az alvadékba, és megszínezi a lárvák testét, ill. a fehérvérsejtek sejtmagjait is. A fenti módon megfestett és két tárgylemez között szénnyomott alvadékrögben jól felismerhetők a lárvák, mert ezek a bazofil festékek az alvadék fehérjéit nem színezik meg (8. ábra).

IRODALOM

1. EUZEBY, J.: *Diagnostic expérimental des helminthoses animales: animaux domestiques, animaux de laboratoire, primates*. Livre 1. Informations techniques des services vétérinaires. Minist. Agric. Paris, 1981. 279–311.
2. FOK, É.: The importance of dirofilariasis in carnivores and humans in Hungary, past and present. In: CRINGOLI, G. (ed.): *Mappe parassitologiche* 8. Rolando Editore. Napoli, 2007. 181–188.
3. FOK, É. – SZABÓ Z. – FARKAS R.: *Dirofilaria repens* első hazai diagnosztizálása kutyában, sebészeti beavatkozás során. *Kisállatorvoslás*, 1998. 4. 218–219.
4. GAÁL T. (szerk.): *Állatorvosi klinikai laboratóriumi diagnosztika*. Sík Kiadó Kft. Budapest, 1999.
5. HAYASAKI, M. – OKAJIMA, J. et al.: Diurnal variation in microfiliariemia in a cat experimentally infected with larvae of *Dirofilaria immitis*. *Vet. Parasitol.*, 2003. 131. 267–271.
6. JACSÓ, O. – MÁNDOKI, M. – MAJOROS, G. – PÉTSCH, M. – MORTARINO, M. – GENCHI, C. – FOK, É.: First autochthonous *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) infection in a dog in Hungary. *Helminthologia*, 2009. 46. 159–161.
7. KASSAI, T.: *Helminthológia*. Magy. Állatorv. Kamara. Budapest, 2011. 278.
8. KNOTT, J.: A method for making microfilarial surveys on blood. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med Hyg.*, 1939. 33. 191–196.
9. PAMPIGLIONE, S. – RIVASI, F. et al.: *Dirofilaria repens* in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. *Histopathology*, 2001. 38. 344–354.
10. PAMPIGLIONE, S. – RIVASI, F.: Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Noctiella) repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. *Parassitologia*, 2000. 42. 231–254.
11. POPPERT, S. – HODAPP, M. et al.: *Dirofilaria repens* infection and concomitant meningoencephalitis. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009. 15. 1844–1846.
12. SZÉNÁSI, ZS. – KOVÁCS-HÁRI, A. – PAMPIGLIONE, S – FIORAVANTI, L. M. – KUCSERA, I. – TÁNCZOS, B. – TISZLAVITZ, L.: Human dirofilariasis in Hungary an emerging zoonosis in Central Europe. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 2008. 120. 96–102.

Közlésre érk.: 2015. jan. 27.

HELYREIGAZÍTÁS

Tisztelt Szerkesztőség!

Sajnálattal vettük észre, hogy a mi hibánkból a Magyar Állatorvosok Lapja januári számának (137. 1. 45–52. oldal) megjelent cikkünk – amelynek címe a „A biofilmképzés hatása antibiotikumokkal szembeni *in vitro* érzékenységre kutyából izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzseknél” – szerzőinek listája helytelenül, hiányosan lett feltüntetve.

A szerzők neve és a szerzők sorrendje helyesen a következő:

Jerzsele Ákos, Albrecht Vivien, Palócz Orsolya, Gálfi Péter és Gyetvai Béla

Jerzsele Ákos