

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

Part 2: Identification of
Dirofilaria species by
morphology of microfilariae

Majoros Gábor*
Juhász Alexandra

G. Majoros*
A. Juhász

1. 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

2. rész: A *Dirofilaria*-fajok azonosítása a mikrofiláriák segítségével

PARAZITOLÓGIA

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők a cikkük első részében a kutyákban előforduló filarioida férgek mikrofiláriáinak felismerési módjait ismertették. E második rész a mikrofiláriák identifikációjával foglalkozik. A Giemsa-festéssel festett lárvák morfológiai vizsgálatával a legtöbb esetben jól el tudjuk különíteni egymástól a *Dirofilaria immitis* és *Dirofilaria repens* fajokat. A lárvák közvetlen vizsgálata különösen hasznos akkor, ha vegyes fertőzöttség áll fenn, mert ebben az esetben a szerológiai és molekuláris vizsgálatok nem feltétlenül adnak értékelhető eredményt. A *D. immitis* lárvák jóval kisebbek a másik faj lárváinál, és elhegyesedő feji végük, továbbá a bennük lévő sejtek elhelyezkedése is elkülöníthetővé teszi őket a *D. repens* lárváktól. Hasznos, ha a már korábban meghatározott, tárgylemezen rögzített és megfestett példányokkal hasonlítjuk össze a vizsgált mintában lévő mikrofiláriákat. Emellett, a szerzők a lárvák mennyiségének megbecsléséhez egyszerű sorozathígítási módszert javasolnak, amihez nem szükséges semmilyen speciális eszköz.

SUMMARY

In the first part of this article the authors described some ways to detect microfilariae of filarioid worms of dog. The second part of the article deals with the identification of microfilariae. By morphological examination of Giemsa-stained microfilariae we can clearly distinguish the *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* species in most cases. Direct examination of the larvae is particularly useful when there is a mixed infection, in which case the serological and molecular tests do not give necessarily appreciable results. *D. immitis* larvae are much smaller than the microfilariae of the other species and their tapered head and the distribution of cells in their body makes them distinguishable from *D. repens* larvae. It is useful if one can compare the freshly found microfilariae to previously defined reference specimens stored on microscopic slide. In addition, the authors suggest a simple serial dilution method of haemolysed blood to estimate the amount of larvae that does not require any special devices.

A cikk első részében azzal foglalkoztunk, hogyan detektálhatjuk a leghatékonyabban a mikrofiláriákat az élő és az elhullott állatokban (17). Az ott ismertetett módszereket gyakorlatilag minden gerinces állat vizsgálatához felhasználhatjuk. A segítségükkel olyan módon nyerhetjük ki a lárvákat a vizsgálati mintákból, hogy azok morfológiai és molekuláris vizsgálatokhoz is alkalmasak maradnak. A ritkán előforduló filarioida fajok mikrofiláriáinak mikroszkópos vizsgálata elengedhetetlen, de nagyon hasznos a kisállatpraxisban előforduló, gyakori paraziták esetében is. Ehhez adunk útmutatást az alábbiakban.

A *D. IMMITIS* ÉS A *D. REPENS* LÁRVÁINAK MORFOLÓGIAI ELKÜLÖNÍTÉSE

Az eltérő kezelés miatt fontos a leggyakoribb hazai filarioida parazitások elkülönítése

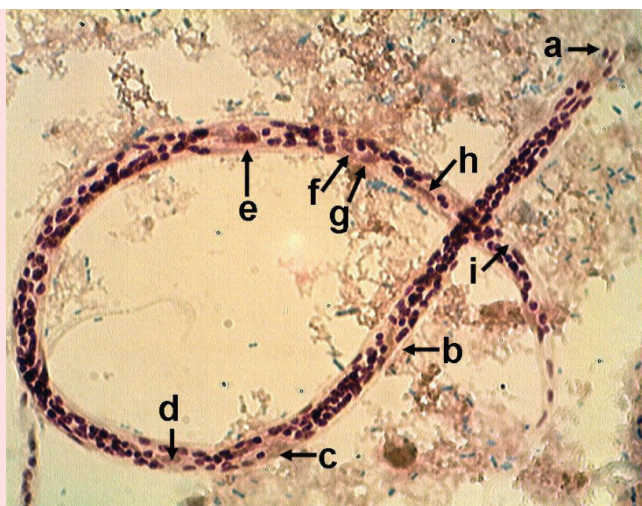
Mivel Magyarországon a kutyák két leggyakoribb filarioida fonálférge eltérő kórjóslatú és eltérő kezelést igénylő parasitosist okoz (9, 15), a specifikus diagnózis felállításának nagy jelentősége van. Ha a kifejlett férgek közvetlen vizsgálatára nincs lehetőség, a mikrofiláriák alapján kell az azonosítást elvégezni. A férgek mikrofiláriái alapján azonban nem könnyű a fajok elkülönítése, sőt a taxonómiában jártas szakértők alapvetően óva intenek a fajoknak csupán a mikrofiláriájuk alapján történő azonosításától (1). Sajnos sem a morfológiai, sem az antigénekben meglévő különbségek nem oly megbízhatóak, hogy csupán önmagukban, ezek segítségével, minden esetben feltétlenül azonosítani tudnánk a mikrofiláriákat (2, 4). A konzervatív nukleinsavszakaszok felépítésében megnyilvánuló sajátosságok mutatkoztak eddig a legmegbízhatóbb elkülönítési lehetőségnek, de a PCR sikeres kivitelezéséhez is legalább olyan lárvasűrűség szükséges, amikor egy milliliternyi vérben több lárvát van (2, 8, 13). (Ennél kisebb lárvakoncentráció esetén a hemolízisen vagy más eljárás alapján lárvakoncentrációt kell igénybe venni az elegendő mennyiségű nukleinsav kinyeréséhez.) Ezért ideális és indokolt esetben több vizsgálati módszert kell együttesen alkalmazni a mikrofiláriák hovatartozásának biztos meghatározására (3, 4). Nincs mindig lehetőség a költségesebb vizsgálatok igénybevételeire, noha kívánatos volna már a lárvák jelenlétének megállapításakor meghatározni a féregfajt, hogy dönthessünk a további kezelésekről. Jelenleg a mindennapi állatorvosi praxis számára a legegyszerűbb és legolcsóbb módszer a mikrofiláriák mikroszkópos vizsgálata, amely azért is kézenfekvő, mert először így ismerjük fel magát a fertőzöttséget és egyben a mikrofilariaemia súlyosságát is.

Az elkülönítéshez a mikrofiláriák mikroszkópos morfológiai vizsgálata a legegyszerűbb és legolcsóbb módszer a praxisban

A mikroszkópos morfológiai vizsgálat az egyszerűsége ellenére nem lebecsülendő, mert az érzékenysége nagyon nagy (12), s ezen felül vele nemcsak a lárvák mennyisége becsülhető meg, hanem a két fajjal való együttes fertőzöttség is egyértelműen felismerhető, ellentétben például a sokszor bizonytalan eredményt adó szerológiai vizsgálatokkal. A véresejtoldást követő lárvaülepítés segítségével nagy mennyiségű vérből kevés lárvát is kinyerhető, mert ha a vér bármilyen kevés lárvét tartalmaz is, a centrifugált anyag pelletéből kivett cseppben nagyon nagy valószínűséggel megtalálhatjuk azokat. Ezen felül, ha pipettával pontosan megmért mennyiségű vért hemolizálunk, akkor egyszerűen megbecsülhetjük a lárvák számát is, például sorozathígítással, a baktériumszámlálásnál alkalmazott szuszpenzióhígításhoz hasonlóan. Az együtt előforduló *D. immitis* és *D. repens* lárvák felismerése és elkülönítése pedig a lárvák formája és nagysága szerint még mindig biztosabb, mint a biokémiai reakciókon alapuló tesztek alapján, mivel a két fajjal való egyidejű fertőzöttség csak nagyon megbízható kontrollon alapján bírálható el egyértelműen. A két fajjal való együttes fertőzöttség esetén az antigéneket, ellenanyagokat vagy nukleinsavakat kimutató eljárások eredménye már elvileg is csak pozitív lehet mindkét fajra nézve, amely eredményekről nem egyszerű eldönteni, hogy valós vagy fals pozitív-e.

A mikroszkópos morfológiai bélyegek nagymértékben függenek a lárvák fixálás előtti állapotától, a rögzítés módjától és a festéstől

A *D. immitis* és *D. repens* megfelelően rögzített és festett mikrofiláriáit morfológiai alapon mindig el lehet különíteni egymástól, de ehhez több lárvá alapos vizsgálatára van szükség. Az eozinofil és bazofil sejtelemeket is feltüntető vérkenetfestő eljárásokkal megfestett mikrofiláriák kontúrja, sejtmagjai és méretei jól vizsgálhatóak. Nem vitás, hogy a mikroszkópban megfigyelhető morfológiai bélyegek nagymértékben függenek a lárvák fixálás előtti állapotától, magától a rögzítés módjától, sőt a festés kivitelezésétől is. A vérvételt követő előlés után frissen megfestett lárvák erősen festődnek, de sejtmagjaik összezsúfolódnak, ezzel szemben a több napig tárolt vérben elpusztult lárvák sejtmagjai különállóan ismerhetők fel a testükben, de halványabban festődnek. A lárvá méretei hipotóniás oldatban kicsit nagyobbak, hipertóniás oldatban kisebbek. A bazofil és eozinofil festékek megkötődésének arányától függően a lárvá alkotóelemei a kék és a piros színek legkülönbözőbb árnyalatait vehetik fel, s ugyanazon képleteknek eltérő lehet a színe a festék minőségétől függően is. A morfológiai azonosítás során azonban a legnagyobb gond inkább az, hogy a keskeny, henger alakú lárvá a tengelyvonala mentén elfordulva bármely helyzetben rögzülhet a tárgylemez felületére, s ezért a benne lévő sejtek mindig máshogy fedik egymást. Emiatt egyes mikrofiláriákban jól látszanak bizonyos sejtes alkotóelemek, másokban nem. Az összes morfológiai jellegzetességet egy lárván szinte sohasem lehet egyszerre megfigyelni, tehát egy mintában több lárvát kell megvizsgálnunk.

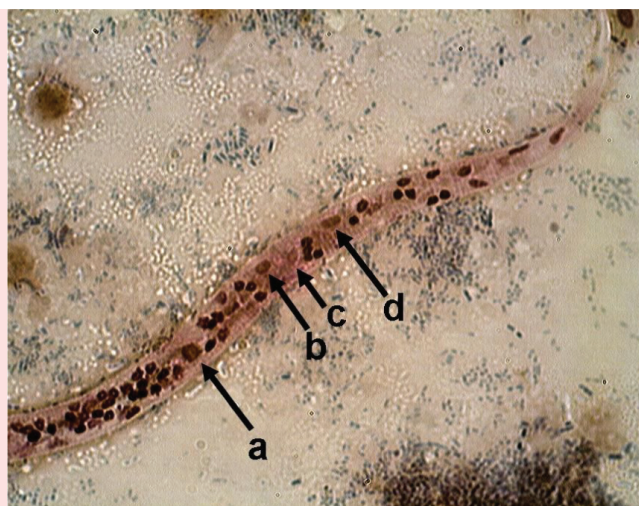


1. ÁBRA. A *Dirofilaria*-fajok mikrofiláriáin elkülöníthető morfológiai képletek pozíciója a *D. repens* mikrofiláriáján szemléltetve

a: feji vég a 3 sejtmaggal; **b:** nyaki (cephalicus) idegyűrű; **c:** kiválasztó nyílás; **d:** kiválasztó sejt; **e:** első „genitális” sejt; **f:** második „genitális” sejt; **g:** harmadik „genitális” sejt; **h:** negyedik „genitális” sejt; **i:** anális nyílás régiója
Giemsa-festés, 800×

FIGURE 1. Positions of recognizable structures of microfilariae of *Dirofilaria* species, illustrated on a specimen of *D. repens* microfilaria

a: cephalic end with 3 nuclei; **b:** cephalic nerve ring on the neck; **c:** excretory pore; **d:** excretory cell; **e:** the first “genital” cell; **f:** the second “genital” cell; **g:** the third “genital” cell; **h:** the fourth “genital” cell; **i:** the region of anal opening



2. ÁBRA. A *D. repens* mikrofiláriájának farki végében lévő nagy, „genitális” sejtek helyzete

a: első „genitális” sejt; **b:** második „genitális” sejt; **c:** harmadik „genitális” sejt; **d:** negyedik „genitális” sejt
Giemsa-festés, 1000×

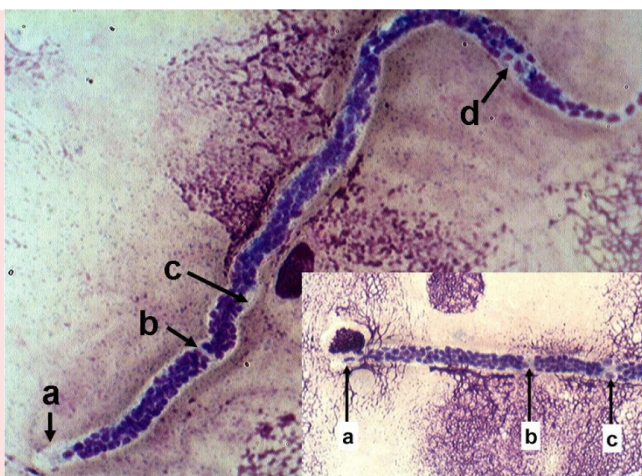
FIGURE 2. The positions of large “genital” cells in the tail of *D. repens* microfilaria

a: the first “genital” cell; **b:** the second “genital” cell; **c:** The third “genital” cell; **d:** The fourth “genital” cell

A két faj mikrofiláriáinak eltérő hossza a legbiztosabb elkülönítési alap

Az interneten bármikor megtalálható, számos mikrofilária-fénykép bizonyítja arra, hogy még egyetlen faj példányai is különbözőképpen képesek rögzülni a preparátumokon, és megfestett mikrofiláriái is eltérhetnek egymástól. Adott esetben még kevésbé hasonlíthatnak egymásra, mint két különböző faj mikrofiláriái. Az elmondottak ellenére mégis a morfológiai azonosítás a leggyakorlatiasabb, és több lárva egyidejű összehasonlíthatósága révén a legtöbb esetet ezzel lehet gyorsan felderíteni.

A méretek variabilitása ellenére, a minket érdeklő két faj mikrofiláriáinak eltérő hossza a viszonylag legbiztosabb elkülönítési alap. Ezen felül, a legtöbb kézikönyv a *Dirofilaria*-fajok mikrofiláriáinak felismeréséhez felhasználható bélyegként említi még a feji vég sejtmagmentes részének alakját, a nyaki idegyűrű, a kiválasztó nyílás, a kiválasztó sejt és a négy, nagy sejtmagvú, ún. „genitális” sejt helyzetét, továbbá az anális pórus elhelyezkedését (1. és 2. ábra). Mindezek az anatómiai képletek azonban nem minden egyes lárván tanulmányozhatók egyforma részletességgel, ezért sok, jól festődő és megfelelően helyeződő lárva van szükségünk a megbízható identifikációhoz. Az elkülönítésre használható alaktani bélyegek egy része csak speciális kezelés után válik láthatóvá (pl. a kiválasztó és az anális pórus; ezek, ill. más sejtek savanyúfoszfatazenzim-aktivitása stb.), vagy csak a lárva bizonyos pozitívájában mérlegelhető a meglétük vagy hiányuk (pl. a fark csúcsának görbülete vagy az ún. „genitális” sejtek helyzete a testben) (7, 12). Ezért korábbi szerzők javaslatai alapján elindulva, a saját vizsgálataink során olyan gyakorlatias morfológiai bélyegeket igyekeztünk találni, amelyek az egyszerű és gyors festési eljárásokkal is könnyen



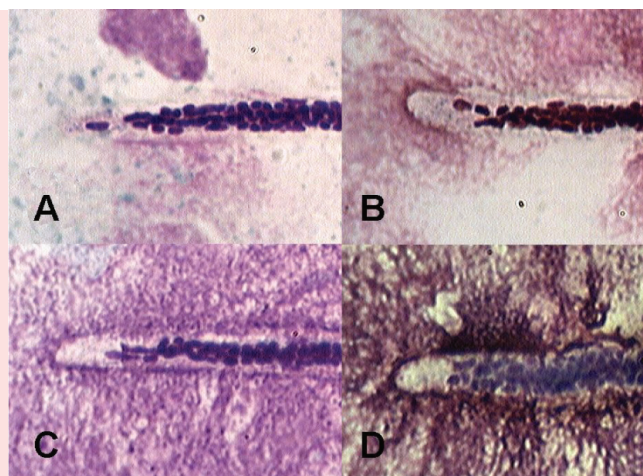
3. ÁBRA. Elpusztult állapotában fixált *D. immitis* mikrofilária a hemolizált vér üledékének kenetében

a: a feji mező; **b:** a feji idegyűrű helye; **c:** a kiválasztó nyílás helye; **d:** a 2. és 3. „genitális” sejt (Inzert: az első három képlet egy teljesen kiegyenesedett lárván)

Giemsza-festés, 500×

FIGURE 3. *D. immitis* microfilaria preserved post mortem within the smear of the sediment of haemolysed blood

a: cephalic space; **b:** position of cephalic nerve ring; **c:** position of excretory pore; **d:** the 2nd and 3rd “genital” cells (Insert: the first three structures on the fore body of a fully straightened larva)



4. ÁBRA. *D. immitis* mikrofiláriák elkeskenyedő feji vége

A feji rész közepén lévő sejtmagokkal (**A**), annak aljában lévő sejtmagokkal (**B** és **C**), ill. sejtmagmentes feji résszel (**D**) Giemsa-festés, 1000×

FIGURE 4. Tapered heads of *D. immitis* microfilariae

Heads of larvae with nuclei in the centre of head space (**A**), with nuclei in the base of head space (**B** and **C**), and without any nuclei (**D**)

felismerhetők és a legtöbb lárván megfigyelhetők. Sok ezer lárvát tanulmányozása alapján, a megbízhatóságuk sorrendje szerint felsorolva, az alábbi jellegzetességeket javasoljuk figyelembe venni a két faj mikrofiláriáinak elkülönítéséhez.

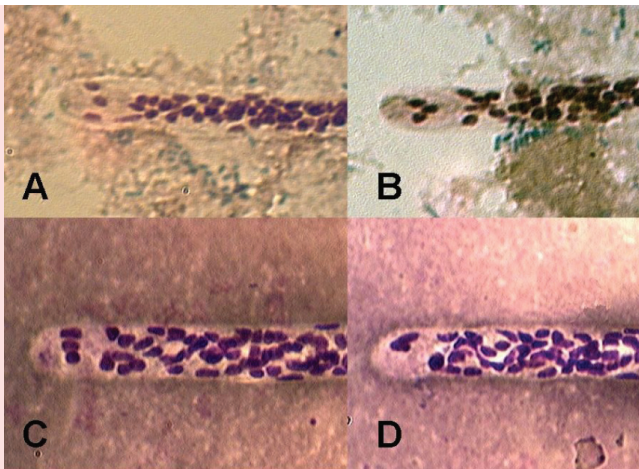
A D. IMMITIS MIKROFILÁRIÁINAK LEGSTABILABB ÉS LEGJOBBAN MEGFIGYELHETŐ MORFOLÓGIAI BÉLYEGEI

A szerzők a megbízhatóságuk sorrendjében, egyszerű festéssel is könnyen felismerhető morfológiai bélyegeket ismertetnek

1. A kinyúlt állapotban megmerevedett lárvát teljes hossza 220–330 μm között van rendszerint, de 340 μm -nél semmiképp sem hosszabb, és a 300 μm -t csak kivételesen haladja meg. Méréseink szerint a hemolízis közben elpusztult vagy hővel fixált állapotában a 270 μm hosszúságú lárvát tekinthető átlagosnak.
2. A feji vég felé a test fokozatosan elkeskenyedik, tehát a feji vég egy kicsit keskenyebb, mint a féreglárvát középső szakaszának szélessége (3. ábra).
3. A feji vég frontális körvonala csúcsos görbe vonalat követ, azaz keskenyen lekerekített, nagyjából parabola alakú (4. ábra).
4. A feji végben lévő világos zóna keskeny, s a benne lévő három sejtmag egymáshoz szorult, ezért rendszerint egynek látszanak, s egymástól elkülönülve nagyon ritkán láthatók. Egy vagy két sejtmag olykor elkülönül az utánuk következő sejtmaghalmozattól, de helyeződésük általában aszimmetrikus, nem jellegzetes (4. ábra).
5. A feji végtől számítva a test első negyedének határán a sejtmagok tömege megszakad, és egy világos foltot látunk (az idegyűrű helyét), majd ettől lejjebb, a test első harmadának végénél egy második világos foltot, a kiválasztó szerv nyílását (lásd: 3. ábra jelzései).
6. A test hátulsó felében lévő „genitális” sejtek magvai többnyire nem különíthetők el jól az őket szorosan körülvevő, szomatikus sejtek magjaitól, de néha egy vagy két ilyen, a többi sejtmagnál nagyobb sejtmag felismerhető a lárvában (3. ábra).

A D. REPENS MIKROFILÁRIÁINAK LEGSTABILABB ÉS LEGJOBBAN MEGFIGYELHETŐ MORFOLÓGIAI BÉLYEGEI

1. A kinyúlt állapotban megmerevedett lárvát teljes hossza általában 320–370 μm közötti lehet – kivételesen 390 μm –, de a 300 μm -t mindig meghaladja. Méréseink szerint előlt állapotában a 350 μm hosszúságú lárvát tekinthető átlagosnak.
2. A test a feji vég felé nem keskenyedik el, ezért a feji vég ugyanolyan vagy majdnem ugyanolyan széles, mint a féreglárvát középső szakaszának szélessége (5. és 6. ábra).
3. A feji vég frontálisan kissé lapított vagy tompán lekerekített, nagyjából boltív alakú (5. ábra).
4. A feji vég világosabb zónája, amelyben három, általában egymástól jól elkülöníthető sejtmag van, széles téglalap alakú. A feji végben látható 3 sejtmag ideális esetben egy szempárhoz hasonló párt alkot, amelyhez egy mögötte lévő folt csatlakozik (5. ábra: A és B). A sejtmagok néha egy vonalba is eshetnek (5. ábra: C), és takarhatják is egymást (5. ábra: D), attól függően, hogy a lárvát hogyan fordul.
5. A test első felében nem tagolódik egyértelműen elhatárolható szakaszokra a sejtmagok tömött sora, hanem lárvagyedenként eltérő helyein ritkul vagy sűrűsödik, ezért stabil helyzetű világos foltok (az idegyűrű és a kiválasztó pórus helye) e lárvát esetében kevésbé egyértelműen határozhatók meg (6. ábra).
6. A test hátulsó felében lévő „genitális” sejtek magvai közül a test középső és utolsó harmadának határán lévő, legfelső sejt nagy magja általában jól látható (6. ábra: a), s a tőle caudalisan fekvő, három hasonlóan nagy „genitális” sejtmag is gyakran elkülöníthető a többi sejtmagtól (2. ábra). E nagy sejtmagok Giemsa-festéssel halványabban szoktak festődni, mint a szomatikus szövet sejtjeinek magjai.



5. ÁBRA. *D. repens* mikrofiláriák tompa feji vége
A feji részben egyenletes eloszlású sejtmagokkal (A), a kobraék „pápaszeméhez” hasonló, legjellegzetesebb elrendeződésű sejtmagokkal (B), egymás mellé sorakozott sejtmagokkal (C), egymást eltakaró sejtmagokkal (D)
Giemsa-festés, 1000×

FIGURE 5. Blunt heads of *D. repens microfilariae*
Evenly distributed cell nuclei (A), the most typical arrangement of nuclei that similar to the “spectacles” of a cobra (B), nuclei that lined up (C), and nuclei partially covering each other (D) lay within the head space



6. ÁBRA. Elpusztult állapotában fixált *D. repens* mikrofilária teljes képe a hemolizált vér üledékének kenetében
a: az első „genitális” sejt magja
Giemsa-festés, 800×

FIGURE 6. General view of *D. repens microfilaria* preserved in dead stage within the smear of sediment of haemolysed blood
a: nucleus of the first “genital” cell

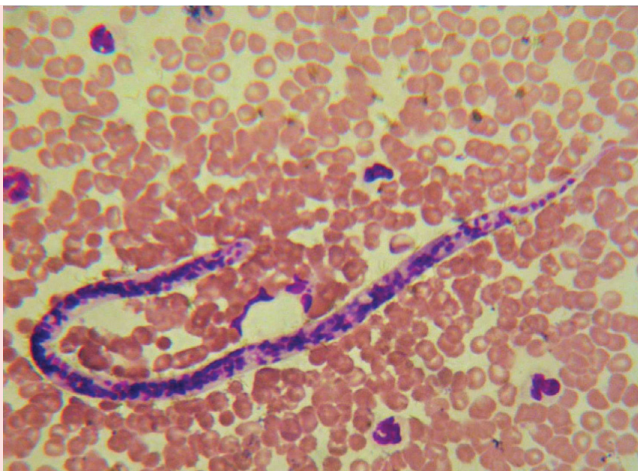
A MIKROFILÁRIÁK MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATÁNAK FOLYAMATA

- A morfológiai jellegzetességek elbírálásakor a következőket kell figyelembe venni:
- Elvileg a testhosszúság csak a teljesen kiegyenesedett lárván mérhető, de az azonos fajú lárvák meghajlott állapotban is azonos testhosszúságúak, ezért egymástól elkülönülő lárvákat tartalmazó, vékonyan szétterített kenetben jól megítélhető, hogy a mikroszkópban látott lárvák egyforma hosszúak-e, vagy sem. Ezért akár már csak néhány kiegyenesedett lárvát megmérve eldönthetjük a vizsgált lárvák méretét. Mindamellert a lárvák testhossza némileg változékony a fajon belül, s a két faj méretei kivételes esetben átfednek. Hosszúságuk megítélésekor azonban irányadónak vehetjük, hogy ha a lárvák túlnyomó többsége 300 μm alatti, akkor *D. immitis* lárvákat látunk, ha ezen érték feletti, akkor *D. repens* lárvákat. A testhossz változékonyága ellenére mégiscsak ez az a jellegzetes bélyeg, ami a legtöbb lárván megítélhető, s a legbiztosabban jelzi annak hovatartozását. Az átlagos nagyságtól eltérő lárvák ritkák, ezért ha a mikrofilariaemiát két faj egyedei okozzák, az azonnal szembeötlik, mivel akkor több, egymástól határozottan elkülönülő méretű lárvát látunk együtt (8. ábra).
 - A test szélessége annak az ozmotikus koncentrációnak a függvénye, amely a lárvát tartalmazó folyadékban a lárvá rögzülésekor fennállt. Emiatt a duzzadt, széles testű lárvá kontúrja jobban mutatja a feji vég elkeskenyedését, mint a zsugorodott, keskeny testű lárvá testalakja. A hipozmotikus közegben (= vízben) állott lárvá sejtmagjai között nagyobb hézagok vannak, mint a friss vérből készült kenetben rögzült lárvák sejtmagjai között (vö. 6. és 7. ábra).

Ha a lárvák többsége 300 μm alatti, akkor *D. immitis*, ha e feletti, akkor *D. repens* fertőzöttség a legvalószínűbb

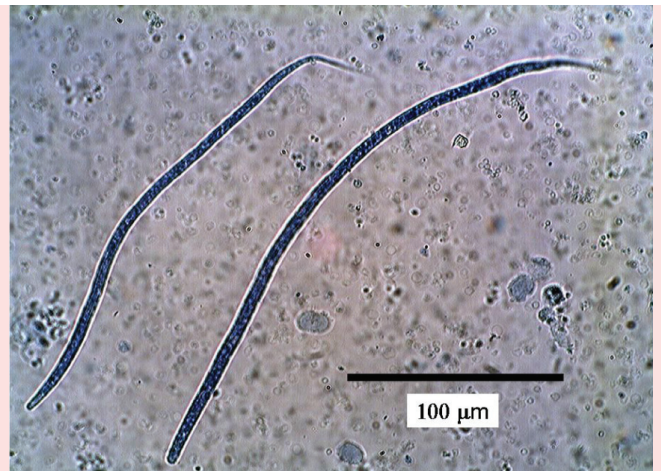
3. Minél keskenyebbre zsugorodott a lárva teste, a feji vég körvonala annál csúcsosabb. Emiatt sok, egyforma módon fixált lárvát kell szemügyre vennünk ennek a bélyegnek a vizsgálatakor. A hemolizátumban leülepedett lárvákon ez a jellegzetesség is jobban látszik, mint a friss vérkenetben festettek.
4. A fej világos végében mindkét faj lárvájának vannak a többi szomatikus sejtek magjaitól elkülönült sejtmagvai, de a *D. immitis* esetében ezek szinte mindig szorosan egymáshoz tapadnak, és szemekre emlékeztető elrendeződést szinte soha nem mutatnak. A test erős zsugorodása esetén egyik faj esetében sem látható jól a fej világos zónája.
5. Világos sávjuk alapján a lárva cephalicus ideggűrűjének és az excretoricus pórusának helyzetét a sejtmagok megfestése után csak akkor lehet jól detektálni, ha a testi sejtek magvai egyenletes sűrűséggel töltik ki a lárva elülső felét (3. ábra, inzert). Ez a feltétel csak a hemolízis után rövid idővel rögzített lárvákon adott, és rendszerint csak a *D. immitis* sűrűbben elhelyezkedő sejtmagokat tartalmazó lárváján valósul meg, míg a *D. repens* lárvájának kissé lazábban elhelyezkedő sejtmagjai között eleve sok kis hézag van, ami miatt a fenti képletek pontos helyzete nem mindig ötlük jól szembe (pl. 6. ábra).
6. A négy „genitális” sejt nagy magja mindkét lárvában megvan, de a *D. repens* esetében legalább az orális vég felé eső, első, legnagyobb sejtmag szinte mindig jól látható (6. ábra), míg a *D. immitis* lárváján csak elvétve. Az e mögötti 2. és 3. nagyobb „genitális” sejtmag egymás közelében van, a 4. pedig tőlük kissé távolabb, a farokvég felé esik. Ez utóbbi, szintén halvány sejtmagok a szokványos festési metódusokkal inkább csak a *D. repens* lárvában ismerhetők fel (2. ábra), a *D. immitis* lárvájában szinte alig, mert beleolvadnak a többi sejtmag sokaságába. Sajnos e speciális sejteknek a magjait nemcsak hogy rendszerint eltakarják a többi sejt magjai, hanem hozzájuk hasonló, a többi sejtagnál szintén nagyobb és halványabb sejtmagok is előfordulhatnak a lárva testének hátulsó testfelében, ezért a felismerésük nehéz.

***D. repens* esetében a négy „genitális” sejt magja körül az orális vég felé eső, legnagyobb sejtmag mindig jól látható, *D. immitis* esetében csak elvétve**



7. ÁBRA. Élő állapota közben fixált *D. repens* mikrofilária teljes vérből készült kenetben
Giemsa-festés, 800×

FIGURE 7. *D. repens microfilaria* preserved while alive within the smear of a fresh blood



8. ÁBRA. Elpusztult állapotában kiegyenesedett, kisebb *D. immitis* és nagyobb *D. repens* mikrofilária
Hemolizátum vizes kenete
Níluskék-festés, 500×

FIGURE 8. Outstretched, dead microfilariae of *D. immitis* (smaller one) and *D. repens* worms
Wet mount of haemolysed blood stained with Nile blue



9. ÁBRA. Friss, festetlen *D. immitis* (felül) és konzervált, megfestett *D. repens* mikrofilária (alul) a fedőlemez felett, ill. alatt. A megfestett és konzervált, hosszabb lárvát a fedőlemez alatt van, a friss és natív, rövidebb *D. immitis* lárvát pedig annak felszínén a vizes szuszpenzióban. A lárváknak az objektív frontlencséjétől való különböző távolsága miatt változó mélységélességgel beállított képek készültek róluk, amelyek utólag CombineZ képalkotó programmal egyesítve lettek 500×

FIGURE 9. Freshly killed native *D. immitis* (above), and stained preserved *D. repens* microfilariae above the cover slip or under

The longer stained and mounted larva lays under the cover slip, while the shorter native *D. immitis* larva lays on the upper surface of cover slip inside aqueous suspension. Due to the diverse distance of larvae from the front lens of objective, in order to extend the depth of field the final image the photographed images were united with help of image program CombineZ

A legfontosabb elkülönítő béléget, a lárvák hossz méretét teljes pontossággal csak az egyenes vonalban rögzült példányok mérésével határozhatjuk meg. Még ha rendelkezünk is kalibrált mérőokulárral vagy digitálisan rögzített képeken használható mérőszoftverrel, nehézkes a sok lárvák hossz méretének megítélése, ha nincs mihez közvetlenül hasonlítanunk azt. Ezért azt javasoljuk, hogy készítsünk festett keneteket egy biztosan identifikált faj mikrofiláriáinak szuszpenziójából, és tartósítsuk azt a szövettani metszetek montírozására használt fedőanyaggal (pl. kanadabalzsam) és fedőlemezzel. Ezt a tárgylemezt összehasonlító etalonként használhatjuk bármely lárvaszuszenzió vizsgálatakor, ha közvetlenül erre csöppentjük rá a meghatározni kívánt lárvákat. A tárgylemezen őrzött, rögzített és az éppen vizsgált lárvákat a mikroszkóp egy látóterében együttesen tanulmányozhatjuk, és ily módon a lárva méretének összehasonlítása könnyebb (9. ábra). Vigyázzunk természetesen arra, hogy a tárgylemezen preparált és az éppen vizsgált lárvákat azonos módszerrel gyűjtsük és rögzítsük (pl. hemolízissel vagy a friss vérből készült kenettel, ill. formalinnal vagy hőkezeléssel), mert az befolyásolja a test méretét. Célszerű az összehasonlításra használt lárvákat vagy elkészített mikroszkópos preparátumot szaklaboratóriumból beszerezni.

Az ismertetett bélégek sem mindig ismerhetők fel biztonságosan, ha a lárvát torzult, rosszul festődött, vagy szennyeződés takarja testüket, ezért a kenet elkészítését gondosan végezzük. A hemolízátum üledékét egyenletesen, a pipetta hegyével terítsük szét a tárgylemezen, miután megnéztük, hogy mennyi benne a lárvát. A mikrofiláriák ne takarják egymást a lemezen. Friss vérkenet készítésekor viszont eleve már csak kevés lárva számíthatunk, amiket ilyenkor fel kell dúsítanunk a kenet elvékonyodó végén. A mikrofiláriák a vérkenet elvékonyodó végének szélére sodródnak a kenetkészítés során, ezért a kenet nagyon kis vérmennyiségből készítsük el, hogy annak szétterülő, szakadozott vége a tárgylemez közepére essen. Ha a kenet egyenes vonalban végződik, vagyis vér torlódik fel a tárgylemez végében, akkor

abban a vastag vércsíkból gyűlnek össze a lárva, és ezért azokat a sok sejt között nehéz észrevenni, s főleg a részleteiket tanulmányozni.

A MIKROFILÁRIÁK VIZSGÁLATÁNAK JÁRVÁNYTANI JELENTŐSÉGE

Mikrofiláriákat csak olyan állatokban lehet találni, amelyek éppen gravid Dirofilariaákat hordoznak, ill. nem sokkal korábban hordoztak

Mikrofiláriákat csak olyan gazdáiban detektálhatunk, amelyek éppen gravid *Dirofilaria* nőtényeket hordoznak, ill. nem sokkal korábban hordoztak, de a lárva túlélte szülőiket. Az okkult parasitizist, vagyis a juvenilis férgek által okozott preimaginális fertőzést, a hím férgek egyedüli előfordulását, továbbá az elhalt férgek jelenlétét, ill. a gazdának a férgek extrakciója utáni állapotát mikrofilariemia hiányában a fenti eljárásokkal nem tudjuk felismerni. Az utóbbi esetekben antigéneket vagy ellenanyagokat még kimutathatunk a vérsavóból, de ezeknek a

A kisállatpraxisokban javasolt még a tünetmentes állatokban is évente legalább egyszer elvégezni mikrofilária-kimutatási vizsgálatot

Az állatorvosi tevékenységgel kapcsolatba kerülő valamennyi állatfajban előfordulhatnak filarioida féregfajok

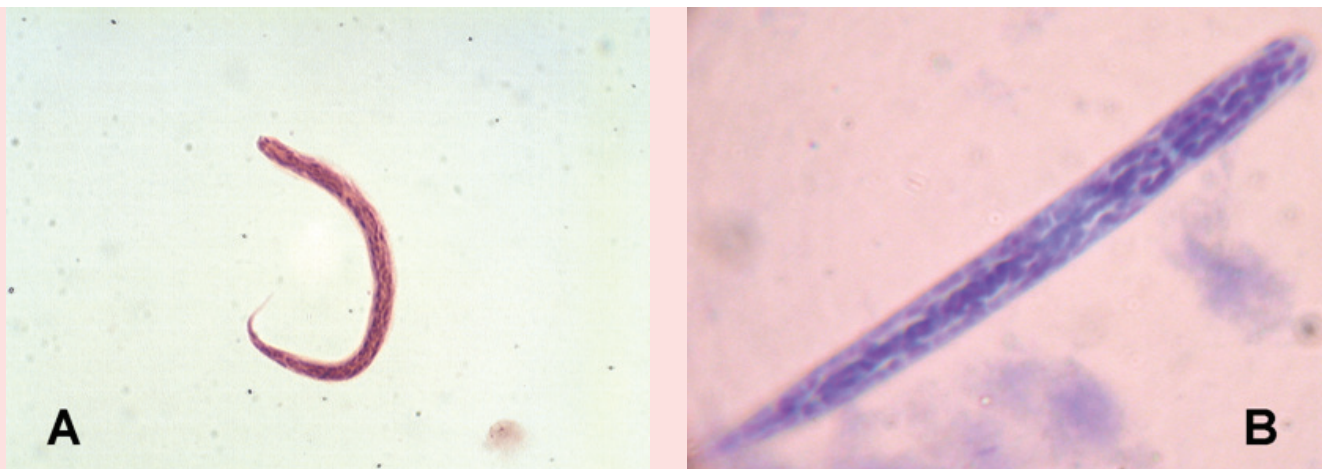
A morfológiai vizsgálatok számának növekedésével megnő az eddig még ki nem mutatott, ritkább féregfajok megtalálásának a valószínűsége

vizsgálatoknak elsősorban egyedi, klinikai jelentősége van, és nem járványtani, mert a mikrofilariaemia nélküli állat nem fertőző. Parazitológiai szempontból a féreghordozó állat klinikai állapotától függetlenül a legfontosabb a pátenst fertőzöttséget hordozó állatok felderítése, mert ezek terjesztik az élősködőt. Ezért a mikrofiláriák kimutatásának még teljesen tünetmentes fertőzöttség esetén is nagy haszna van. A kisállatpraxist folytató állatorvosok számára javasoljuk, hogy még adekvát tünetek hiánya esetén is mindegyik, a fertőzésre fogékony paciensüknél évente legalább egyszer végezzenek mikrofilária-kimutatási vizsgálatot, mert ez lenne a dirofilariosis visszaszorításának leghatékonyabb módja.

A gerincesek több száz leírt filarioida féregfaja alapján feltételezhető, hogy az állatorvosi tevékenységgel kapcsolatba kerülő minden állatfajban elvileg találhatunk hasonló férgemet (21). A legtöbb gazdafajnak több filarioida faja is lehet. Így a kutyának is, az eddig tárgyalt dirofiláriákon kívül más filarioida parazita fajai is vannak, és egyre nagyobb a valószínűsége annak, hogy ezek a nálunk eddig meg nem talált fajok is diagnosztizálásra kerülnek a jövőben Magyarországon. A mikrofiláriák kimutatásának jelentősége az utóbbi években ugrásszerűen megnőtt világszerte, mert nemcsak a *D. immitis*, hanem több állatfaj filarioida féregfaja is erősen terjedő hajlamot mutat. Például az amerikai eredetű *Acanthocheilonema*-fajok közül már nagyon gyakori kutyában az *Acanthocheilonema reconditum* Dél-Európában (18, 22), ugyanakkor az európai *D. repens* elkerült Amerikába is (19). Az európai mezei nyúlban megjelent az ugyancsak Észak-Amerikából származó *Dirofilaria scapiceps* (6), és több, alkalmi európai behurcolás után, a trópusi területeken elterjedt *Parafilaria bovicola* autochthon előfordulását is regisztrálták nemrégén olaszországi szarvasmarhákban (11). A jövevény fajok mellett, természetesen az őshonos filarioidák mikrofiláriáira is számíthatunk a vér- vagy bőrbioptizációs vizsgálatok során. Magyarországon a vadon élő és házasított patásokban például nem ritkák a más állatokat is fertőzni képes *Setaria*-fajok, de csak néha szembesülünk a kártételükkel (14). Az *Onchocerca*-fajok is számos emlősben és az emberben is képesek megtelepedni, és valószínűleg a kutyák onchocercosisa is gyakoribb lehet, mint korábban gondoltuk (20).

A kisállatpraxis gyakorlása során a morfológiai vizsgálattal felismert mikrofiláriák az eddig még ki nem mutatott, vagy ritkább féregfajok megtalálásának valószínűségét növelik. Ezért még abban az esetben is érdemes mikrofiláriákat keresni, ha a keringő vérben nem találunk ilyeneket, de a bőr alatti csomók vagy a műtétek közben talált féregdarabok a filariózis gyanúját felkeltik. Ebben az esetben az elváltozás területéről származó nyirkot kell megvizsgálni. Az ismeretett *Dirofilaria*-lárváktól lényegesen eltérhetnek a kisebb *Acanthocheilonema*- és különösen az *Onchocerca*-mikrofiláriák, mely utóbbiakat a kipréselt szövethedvekből lehet kimutatni (10. ábra). Ahogyan emberben, úgy az állatokban is előfordulhatnak opportunistá fertőzések, mert ezek a férgek hajlamosak nem a nekik megfelelő gazdában is fejlődésnek indulni. Ezért számítsunk arra, hogy a *D. repens* és *D. immitis* fertőzésen kívül egyéb fajspecifikus, vagy alkalmilag megtelepedett filarioida férgekkel is találkozhatunk a kutyákban.

Amennyiben a klinikai vizsgálatot végző állatorvosnak nincsen lehetősége elbírálni az állattól vett vérminta lárvatartalmát, bízza azt szaklaboratóriumra. Ebben az esetben is nagyon ajánlott azonban, ha nemcsak alvadásában gátolt vért küld laborvizsgálatra, hanem a javasolt módon frissen hemolizálja a levett vérnek legalább egy részét, és annak üledékéből tárgylemezre szárított kenetet készít. Hematokrit centrifugában ülepített vagy állott vér „buffy coat” rétegéből is készíthetünk kenetet, mert a mikrofiláriák a fehérvérsejtekkel egyforma fajsúlyúak, és azokkal egy rétegben gyűlnek össze a leülepedett vörösvérsejtek halmazának tetején. Az előbbi lehetőségek hiánya esetén, közvetlenül a friss vérből készített kenet még mindig lehetőséget ad a mikrofiláriák megtalálására, de ilyenkor egy vérmintából készítsünk sok kenetet, hogy a lárvák megtalálásának esélyét növeljük.



10. ÁBRA. Bőralatti szövetek nedvének üledékében lévő, *Onchocerca lupi* mikrofiláriák
Giemsa-festés **A:** 500×, **B:** 1000×

FIGURE 10. *Onchocerca lupi microfilariae* in the sediment of subcutaneous interstitial fluid
A: 500×, **B:** 1000×

A tárgylemezre szárított, vékony vér- vagy üledékkenet állapotváltozás nélkül tökéletesen megőrizhető még alkoholos fixálás nélkül is, és tárgylemeztartóban vagy akár tiszta, pormentes papírlapba csomagolva is könnyen szállítható.

A MIKROFILARIAEMIA INTENZITÁSÁNAK NYOMON KÖVETÉSE

A *Dirofiláriákkal* fertőzött állat gyógykezelésének sikerességét a vérben lévő mikrofiláriák mennyiségének csökkenéséből majd eltűnéséből mérhetjük le. Természetesen minél kevesebb lárva van a perifériás vérben, annál nehezebb megtalálni azokat, holott az állat fertőzésmentességének tényét csak a vér teljes lárva mentessége esetén lehet feltételezni. Ezért ellentmondás van azon törekvések között, hogy egyrészt minél nagyobb mértékben koncentráljuk a lárvákat a megtalálásuk érdekében, másrészt egységnyi térfogatú vérben számoljuk meg a lárvákat a mennyiségi változás nyomon követése céljából. A lárva számának egész pontos változását inkább csak tudományos indokból, ellenőrzött klinikai vizsgálatok során szokták megállapítani (10). Erre számos, speciális technikai megoldás van, a számlálókamrától az elektromos ellenálló képességet mérő műszeren át a filtrációs eszközökig (1, 5). Akármely módszer választjuk is a lárvaszámláláshoz, az eljárás pontosságának feltétele, hogy mindig azonos módon számoljuk a mikrofiláriákat azért, hogy legalább a metodikai hibákból adódó szórás minél kisebb legyen. A lárva mennyiségének napszakos ingadozása és azok egyenlőtlen vérbeli eloszlása miatt magából a mintavételből adódó hiba a mikrofiláriák számlálásakor nagyságrendekkel több lehet, mint a módszertani hiba, ezért a gyakorlati diagnosztika igényeit kielégíti a sorozathígítási módszer.

Ha meghatározott mennyiségű vért meghatározott mennyiségű desztillált vízzel hígítunk, a keverékből egy kalibrált pipettával kivett egységnyi mennyiségű folyadékban talált lárva száma alapján könnyen kiszámolhatjuk a vér lárva koncentrációját. A pipettából cseppenként engedjük ki azt a térfogatú folyadékot (pl. 0,1–0,2 ml-t), amiben meg akarjuk számolni a lárvákat, és hogy a cseppek ne folyjanak össze, minden cseppet önálló tárgylemezre teszünk. Így könnyebb a

A gyógykezelés sikerességének ellenőrzésére végzett lárvaszámláláshoz mindig ugyanazt a módszert kell alkalmazni

Meghatározott mennyiségű vért és desztillált vizet felhasználva, kalibrált pipetta segítségével kiszámolhatjuk a vér lárvakoncentrációját

számolás. Az összes cseppben megszámlolt lárvá összege lesz az a lárvamenyiség, amely a pipettával kimért folyadékban volt. (Az egyes cseppekben lévő lárvák száma között nagy különbség lehet, mert a lárvák ülepedni kezdenek már magában a pipettában is.) Ha a cseppekben megszámlolhatatlanul sok lárvá volna, az eredeti vér-víz keverék egy általunk meghatározott mennyiségét hígítsuk tovább, pl. a tízszeresére. A hígítási sort folytatva végül olyan hígítást kaphatunk, amelyben már könnyen megszámlolhatók a lárvák. A lárvák jobb megtalálhatósága érdekében az első, hemolízist okozó hígítás alkalmával használjunk níluskéses festést, s mivel a számolási műveletnél nem fontos a lárvák élő állapota, ekkor már előlhetjük őket egy kevés formalinnal, mert a sötét színű, mozdulatlan lárvákat számolni könnyebb, mint az élőket.

Az eredményes gyógykezelés után olyan kevés lehet a vérben lévő mikrofilária, hogy emiatt a vért nemhogy hígítanunk, hanem a lárvákat koncentrálnunk kell azok megtalálása érdekében. Ekkor a fenti módon hemolizált vért centrifugáljuk, és az üledékben található lárvákat számoljuk meg, pipettával kiszippantva azokat. Ha nincs lehetőségünk elhegyesedő aljú centrifugacsövet használni, figyeljünk arra, hogy a gömbölyű fenekű cső görbülete mentén szétoszlanak a lárvák. Ezért egymás után többször kell felszippantanunk a centrifugacső aljáról az üledéket a pipettával, mert az első szippantáskor rendszerint nem az összes lárvá kerül a pipettába.

A cikkünkben leírt eljárásokat a gyakorló állatorvosok által fenntartott kisebb laboratóriumokban is alkalmazni lehet. Ez nem jelenti egyúttal azt, hogy begyakorlás nélkül is tökéletes eredményt érünk el a segítségükkel. A laboratóriumi technikákban kevésbé járatos kollégák számára azt javasoljuk, hogy ha mikrofiláriákat tartalmazó vérmintához jutnak, annak első vizsgálatát követően azt 4 °C-os hűtőszekrényben őrizzék néhány napig, és gyakorlás céljából abból ismételt vizsgálatokat végezzenek. A lárvaszuszpenzióból készítsenek sok, tárgylemezre szárított és alkohollal fixált kenetet, amelyekből egyet-egyét mindig akkor fessenek meg, amikor az aktuálisan vizsgálni kívánt lárvákat is megfestik. Ezzel kontrollálják az éppen alkalmazott festési módszer minőségét, és egyben szemük gyakorlottságát is fokozzák.

Hangsúlyozzuk, hogy az általunk ajánlott vizsgálati módszerek ugyan önmagukban nem mindig megfelelőek az egzakt, tudományos igényű identifikációhoz, de széles körű alkalmazásuk nagyban elősegítené a két *Dirofilaria*-faj elterjedtségének és gyakoriságának felmérését. A nagyon sok vizsgálat eredménye ugyanis kompenzálja a bizonytalanságokból adódó hibákat, és több lehetőséget is ad a nehezen felderíthető esetek alaposabb kivizsgálására. Közös érdek tehát, hogy minél több állatorvos tegyen szert gyakorlatra a mikrofiláriák kimutatásában és elkülönítésében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők hálás köszönettel tartoznak FOK ÉVÁNAK, aki a dirofilariosissal kapcsolatos kutatómunkája során a legtöbb vérmintát volt szíves vizsgálat céljából a rendelkezésükre bocsátani.

IRODALOM

- BARTLETT, C. M.: Filarioid nematodes. In: ATKINSON, C. T. – THOMAS, N. J. – HUNTER, D. B. (eds.): *Parasitic diseases of wild birds*. J. Wiley and Sons Inc. Chichester, 2008. 439–462.
- CASIRAGHI, M. – BAZZOCCHI, C. et al.: A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Vet. Parasitol.*, 2006. 141. 368–372.
- CIOCAN, R. – DĂRĂBUȘ, GH. – IGNA, V.: Morphometric study of microfilariae of *Dirofilaria* spp. on dogs. *Bulletin UASVM*, 2010. 67. 45–49.
- CIOCAN, R. – DĂRĂBUȘ, GH. – JACSÓ, O. – FOK, É.: Detection of *Dirofilaria* spp. in dogs by PCR. *Bulletin UASVM*, 2010. 67. 40–44.
- DENHAM, D. A. – DENNIS, D. T. et al.: Comparison of a counting chamber and thick smear methods of counting microfilariae. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1971. 65. 521–526.
- DIAKOU, A. – SOKOS, C. – PAPADOPOULOS, E.: Endoparasites found in European brown hares (*Lepus europaeus*) hunted in Macedonia, Greece. *Helminthologia*, 2014. 51/4. 345–351.

7. EUZEBY, J.: *Diagnostic expérimental des helminthoses animales: animaux domestiques, animaux de laboratoire, primates; Livre 1.* Paris, Minist. Agric., édit. Informations techniques des services vétérinaires. 1981. 279–311.
8. FAVIA, G. – LANFRANCOTTI, A. et al.: Polymerase chain reaction – identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*, 1996. 113. 567–571.
9. FOK, É. – JACSÓ, O. – SZEBENI, Zs. – GYÖRFFY, A. – SÜKÖSD, L. – LUKÁCS, Z. – SCHAPER, R.: Elimination of *Dirofilaria* (syn: *Notchiella*) *repens* microfilariae in dogs with monthly treatments of moxidectin 2.5%/imidacloprid 10% (Advocate®, Bayer) spot on. *Parasitol. Res.*, 2010. 106. 1141–1149.
10. FOK, É.: The importance of dirofilariosis in carnivores and humans in Hungary, past and present. In: CRINGOLI, G. (ed.) *Mappe parassitologiche* 8. Rolando Editore. Napoli, 2007. 181–188.
11. GALUPPI, R. – MILITERNO, G. et al.: Evidence for bovine parafilariosis in Italy: First isolation of *Parafilaria bovicola* (Tubangui, 1934) from autochthonous cattle. *Vet. Parasitol.*, 2012. 184. 88–91.
12. GENCHI, C. – VENCO, L. – GENCHI, M.: Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. In: CRINGOLI, G. (ed.) *Mappe parassitologiche* 8. Rolando Editore. Napoli, 2007. 139–144.
13. GIOIA, G. – LECOVÁ, L. et al.: Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Vet. Parasitol.*, 2010. 172. 160–163.
14. JAKAB, CS. – GYÖNGY, F. – MÁNDOKI, M. – MAJOROS, G.: Setariosis okozta hashártyagyulladás és helyi perineuritis szarvasmarhában. Esetismertetés. *Magy. Állatorv. Lapja.*, 2011. 133. 387–395.
15. KASSAI, T.: *Helmintológia*. Magy. Állatorv. Kamara. Budapest. 2011. 278.
16. LAKI, A. J. – IVÁN, K. – FOK, É. – CIVERA, P.: Filtration of nematodes using an integrated microcapillary system. *Bionanoscience*, 2014. 4.338–348.
17. MAJOROS G., – JUHÁSZ A.: A *Dirofilaria immitis* és *Dirofilaria repens* mikrofiláriák fénymikroszkópos vizsgálata – 1. rész: A mikrofiláriák felismerése a különféle mintákban. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2015. 137. 173–180.
18. NAPOLI, E. – GAGLIO, G. et al.: New insights into the biology and ecology of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida: Onchocercidae). *Parasit. Vectors.*, 2014. 7(Suppl 1). O29.
19. RISHNIW, M. – BARR, S. C. et al.: Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.*, 2006. 135. 303–314.
20. SRÉTER, T. – SZÉLL, Z.: Onchocercosis: a newly recognized disease in dogs. *Vet. Parasitol.*, 2008. 151. 1–13.
21. SZONYIN, M. D.: Emberi és állati filarioidák és az általuk okozott betegségek. (Osznovi nematodológiai, XXVIII. kötet) Nauka, Moszkva, 1977. 219.
22. TASIĆ, A. – ROSSI, L. et al.: Survey of canine dirofilariosis in Vojvodina, Serbia. *Parasitol. Res.*, 2008. 103. 1297–1302.
- Közlésre érkező: 2015. jan. 27.