

# Przypadek wykrycia nicienia *Dirofilaria repens* w jądrze psa\*)

ALEKSANDER W. DEMIASZKIEWICZ, JACEK KARAMON\*, AGNIESZKA JASIK\*\*

Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

\*Zakład Parazytologii, \*\*Zakład Anatomii Patologicznej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

## Demiaszkiewicz A. W., Karamon J., Jasik A. Case of *Dirofilaria repens* in a testis of a dog

### Summary

*Dirofilariasis* caused by *Dirofilaria repens* nematodes is a parasitosis occurring in dogs, cats and wild carnivores in southern Europe. In Poland it was found for the first time in 2009 in dogs in the Mazovian Province. The nematodes of that species are mostly found in nodules located in the subcutaneous connective tissue or intramuscular connective tissue of the trunk and legs. The aim of this paper was to describe a case *D. repens* nematode located in a dog's testicular parenchyma. An eight-year-old German shepherd dog was found to have an enlarged left testis. After castration, during the extraction of a sample from the removed testis for histopathological examination, an oval, three-centimeter-wide cyst filled with clear liquid was found. Inside the cyst, a long, spirally rolled white nematode was detected – a mature female belonging to the *D. repens* species. In the dog's blood, microfilariae of that parasite were also identified. The histopathological examination of the cyst wall showed the presence of a tumor composed of Leydig cells of a cyst-vascular type. The dog came from the Mazovian Province and had never been away, which suggests that this was a native invasion. This is the first case of *D. repens* in an intra-testicular location in a dog.

**Keywords:** *Dirofilaria repens*, dog, testis, Leydig cell tumor

Nicienie *Dirofilaria repens* są szeroko rozpowszechnionymi w południowej Europie pasożytami psów, kotów i dzikich mięsożernych. Lokalizują się w tkance łącznej podskórnej i międzymięśniowej, powodując dirofilariozę podskórną. Samice nicieni rodzą liczne larwy I stadium zwane mikrofilariami. Żywicielami pośrednimi i przenosicielami (wektorami) omawianych nicieni są liczne gatunki komarów należące do rodzajów: *Anopheles*, *Aedes* i *Culex*. Komary podczas żerowania pobierają krew zarażonych zwierząt wraz ze znajdującymi się w niej mikrofilariami. Dla rozwoju tych larw do stadium inwazyjnego niezbędna jest temperatura nie niższa niż 14°C. Mikrofilarie w okresie od 24 godzin do 3 dni przedostają się z jelita owadów do cewek Malpighiego, gdzie rosną i lineją dwukrotnie. Po osiągnięciu stadium inwazyjnego migrują do głowy komara i lokalizują się w jego narządach gębowych. Okres, w którym larwy osiągną stadium inwazyjne, jest uzależniony od gatunku komara oraz temperatury środowiska i waha się od 10 do 21 dni. Podczas następnego pobierania krwi przez komara larwy inwazyjne wnikają pod skórę żywiciela ostatecznego

i po upływie 13-14 dni oraz kolejnej lince osiągają IV stadium. Wówczas larwy rozpoczynają wędrówkę do miejsc swojej stałej lokalizacji. W czasie wędrówki jeszcze raz lineją i w okresie od 6 do 9 miesięcy osiągają dojrzałość płciową. Dojrzałe nicienie żyją od 2 do 4 lat (1, 8, 20).

W ostatnich latach rodzimą dirofilariozę psów wywoływaną przez *D. repens* stwierdzono w 2005 r. na Słowacji (18), w 2006 r. w Czechach (19), oraz w 2009 r. w Holandii, Niemczech i Austrii (9, 12, 16). Ekstensywność inwazji psów stwierdzona w 2009 r. w kilku ogniskach w centralnej Polsce wahała się od 24,1% do 60% (3). Obserwowany zasięg dirofilariozy przesuwają się na północ, co jest prawdopodobnie skutkiem globalnego ocieplenia (6).

Poniżej opisano przypadek obecności nicienia *D. repens* w mięszu jądra psa.

### Materiał i metody

**Zwierzęta.** Pies A (owczarek niemiecki, samiec, lat 8, przebywający w jednostce wojskowej w woj. mazowieckim) z powiększonym lewym jądrem został skierowany na kastrację. W trakcie pobierania wycinka do badań histopatologicznych z usuniętego jądra w jego mięszu stwierdzo-

\*) Badania sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Nr N N308 560540.

Ryc. 1. Koniec przedni samicy *D. repens*Ryc. 2. Koniec tylny samicy *D. repens*

no owalną cystę (o średnicy ok. 3 cm) wypełnioną klarownym płynem. Wewnątrz cysty wykryto długiego, spiralnie zwiniętego nicienia o barwie białej. Nicienie został umieszczony w płynie fizjologicznym (0,9% NaCl), a następnie zakonserwowany w 70% etanolu z dodatkiem glicerolu (5%) i poddany identyfikacji przy użyciu mikroskopu Olympus 50 BX oraz programu CellD. Po upływie miesiąca od psa A i dodatkowo od dwóch innych klinicznie zdrowych psów (owczarki niemieckie, samce, pies B – 5 lat i pies C – 7 lat) przebywających na terenie tej samej jednostki wojskowej pobrano krew do badań w kierunku obecności mikrofilarii (do próbek zawierających antykoagulant EDTA) oraz do badań serologicznych (do próbek zawierających aktywator wykrzepiania).

**Badanie w kierunku mikrofilarii.** Do badania krwi w kierunku mikrofilarii użyto dwóch metod (metody Knotta i metody kapilarnej Kingstona i Mortona). Metoda Knotta zmodyfikowana została przez Ben-Mahdi i Madani (2). Najpierw 1 ml krwi mieszano z 2% roztworem formaliny (9 ml) w celu zniszczenia erytrocytów. Po 2-3 minutach mieszaninę wirowano przez 5 minut ( $1500 \times g$ ), supernatant odrzucono, a osad przeniesiono na 3 szkiełka podstawowe (po 35-45  $\mu l$  na szkiełko) i wykonano rozmazy. Rozmazy barwiono poprzez zanurzenie w 0,2% roztworze błękitu metylenowego przez 2-3 minuty. Po wyschnięciu preparaty oglądano pod mikroskopem (powiększenie 100-400  $\times$ ) w celu wykrycia mikrofilarii. Metoda kapilarna Kingstona i Mortona (7), wykorzystywana do wykrywania świrdrowców występujących we krwi przeżuwaczy, została zaadaptowana do wykrywania mikrofilarii. Pozwala ona również na zbadanie intensywności zarażenia poprzez ustalenie liczby mikrofilarii w określonej ilości krwi odwirowanej w kapilarze hematokrytowej.

**Badanie w kierunku antygenów *D. immitis* (ELISA).** W celu wykluczenia zarażenia nicieniami *Dirofilaria immitis* surowice były badane w kierunku wykrycia antygenów krążących tego pasożyta za pomocą komercyjnego zestawu ELISA SensPERT Canine Heartworm Test Kit firmy VetAll Laboratories, zgodnie z instrukcją producenta.

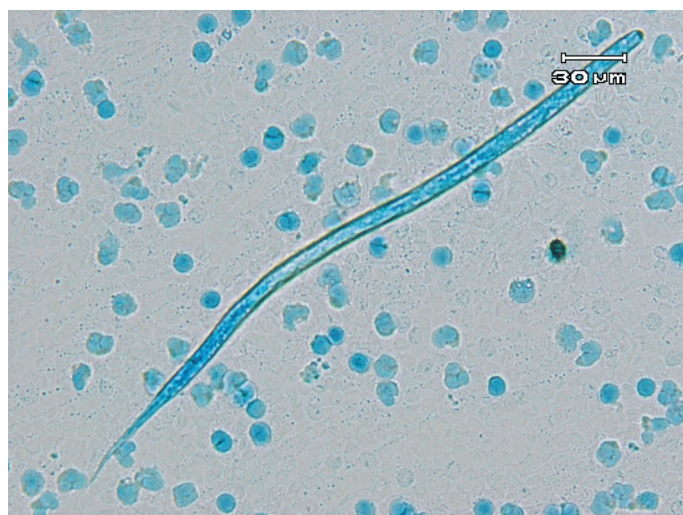
**Badania histopatologiczne.** Wycinek jądra zawierający fragment cysty został poddany badaniu histopatologicznemu. Pobrane ze zmienionego jądra wycinki utrwalono

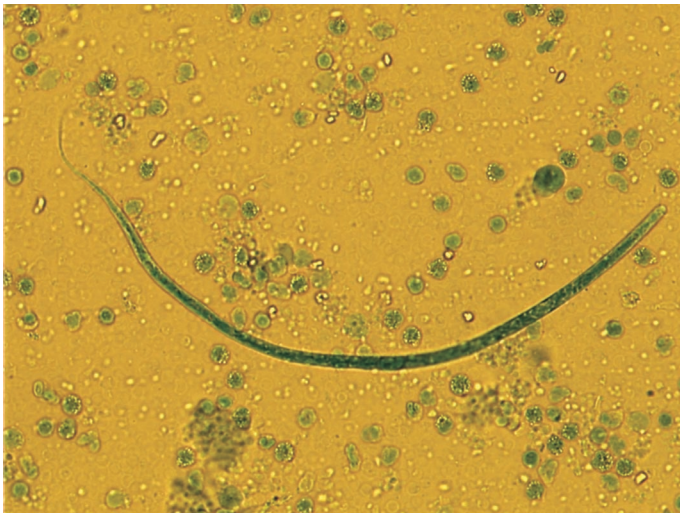
w 10% obojętnej formalinie, a następnie przeprowadzono rutynowo do bloczków parafinowych i krojono na skrawki histologiczne o grubości 5  $\mu m$ . Rozpoznania preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną dokonano w oparciu o klasyfikację guzów układu rozrodczego wg WHO.

### Wyniki i omówienie

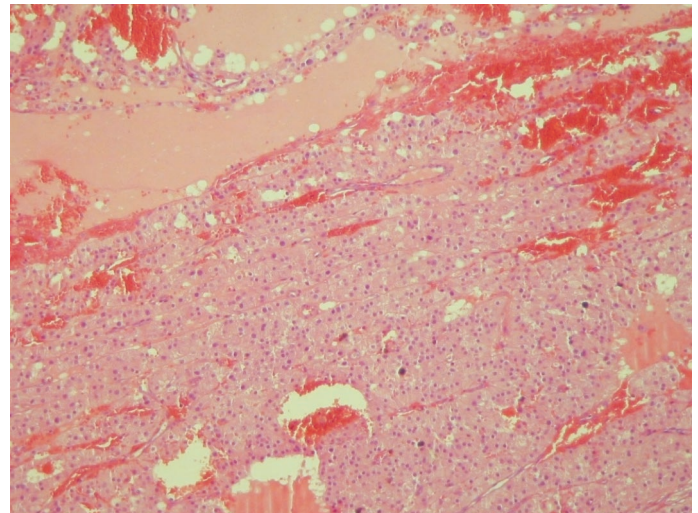
Na podstawie cech morfologicznych wyizolowany z jądra pasożyt został zidentyfikowany jako dojrzała samica nicienia z gatunku *Dirofilaria repens* (ryc. 1-2). Długość ciała tego pasożyta wynosiła 157 mm, a średnica 0,502 mm. Stwierdzono wyraźne podłużne i delikatne poprzeczne prążkowanie oskórka, charakterystyczne dla tego gatunku.

Badania krwi zarówno metodą Knotta (ryc. 3), jak i metodą kapilarną (ryc. 4) wykazały obecność mikrofilarii *D. repens* u psa A. Za pomocą metody Knotta wykryto 23 mikrofilarie w 1 ml badanej krwi, natomiast w metodzie kapilarnej pojedyncze mikrofilarie w 30  $\mu l$ . Na podstawie wyników intensywność inwazji mikrofilarii można ocenić jako niską. U pozostałych dwóch psów (B i C) nie wykazano obecności

Ryc. 3. Mikrofilaria *D. repens* w metodzie Knotta



Ryc. 4. Mikrofilaria *D. repens* w metodzie kapilarnej



Ryc. 5. Ściana cysty – guz z komórek Leydiga

mikrofilarii we krwi. Badanie surowicy nie wykazało obecności antygenów krążących *Dirofilaria immitis*, co wykluczyło obecność larw tego gatunku u zarażonego psa.

W obrazie mikroskopowym badanych wycinków jądra stwierdzono obecność wielokątnych komórek tworzących lite pola oraz struktury pseudogruzołowe, wsparte na cienkim łącznotkankowym zrębie, otaczające przestrzenie wypełnione wydzieliną, zawierającą liczne skupiska erytrocytów. Komórki nowotworowe charakteryzują się obfitą kwasochłonną cytoplazmą, zawierającą drobne wakuole tłuszczowe. W cytoplazmie pojedynczych komórek obserwowano również ziarna lipochromowego barwnika. Jądra komórkowe były okrągłe, hyperchromatyczne, zawierające jedno jąderko i charakteryzujące się dużą anizokariozą. Powyższy obraz histopatologiczny wskazywał na obecność guza z komórek Leydiga typu cystowato-naczyniowego (ryc. 5).

Umiejscowienie nicieni *D. repens* w mięszu jądra psa nie było dotąd opisywane. Równie rzadko stwierdzane są te pasożyty w worku mosznowym psów. Podczas kastracji 4-letniego owczarka niemieckiego w okolicach Warszawy stwierdzono w mosznie pod osłonką pochwową jądra sześć nicieni *D. repens* (3), najczęściej jednak nicienie tego gatunku u psów umiejscawiają się w guzach zlokalizowanych w tkance łącznej podskórnej lub międzymięśniowej grzbietu albo kończyn. Inwazja tego pasożyta może przebiegać bezobjawowo, jednak często obserwowane są: guzkowate wieloogniskowe zapalenie skóry lub obecność swędzących wykwitów w postaci grudek, a także wieloogniskowe wyłysienia i rumień, hiperpigmentacja oraz nadmierne rogowacenie. Niekiedy występują w skórze ropne zmiany zapalne. Opisane zmiany towarzyszą obecności dojrzałych nicieni pod skórą lub mikrofilarii w skórze (1, 20).

Stwierdzoną w niniejszych badaniach obecność w jądrze psa cysty z nicieniem trudno powiązać przy-

czynowo ze zmianami nowotworowymi w postaci guza z komórek Leydiga, jednak we wcześniejszych badaniach prowadzonych w naszym kraju stwierdzano u psów zarażenie dirofilariozą towarzyszące złośliwym nowotworom (17).

U ludzi nicienie *D. repens* znajdowane były wielokrotnie w okolicy jąder w powrózku nasiennym lub w mosznie (5, 10, 14). Prawdopodobnie spowodowane jest to faktem, że człowiek nie jest typowym żywicielem dirofilarii, a żywicielem przypadkowym, u którego nicienie częściej umiejscawiają się w tej nietypowej lokalizacji. Na terenie Unii Europejskiej stwierdzono łącznie już ponad 270 przypadków dirofilariozy u ludzi. Do 1995 r. opisanych zostało 410 przypadków dirofilariozy człowieka w 30 krajach na całym świecie. Kolejne 372 przypadki w 25 krajach zostały zarejestrowane w latach 1995-2000. Nicienie lokalizowały się także w tkance łącznej podskórnej, głównie w górnych częściach ciała, w płucach, w sieci, w najądrzu i w powrózku nasiennym, pod spojówką oka, a także w węzłach chłonnych. Średnica guzów zawierających nicienie wynosiła od 10 do 25 mm. Guzy podskórne lub płucne wywoływane przez *D. repens* były niekiedy mylone ze zmianami nowotworowymi. Dirofilarioza u ludzi była najczęściej diagnozowana w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym. Guzy umiejscowione w płucach były wykrywane podczas rutynowego badania rentgenowskiego (11, 13, 15). Nicienie *D. repens* u człowieka najczęściej nie osiągały dojrzałości płciowej, dlatego też wykrycie mikrofilarii we krwi pacjentów jest niezwykle rzadkie. W Polsce stwierdzono dotychczas u ludzi 5 przypadków dirofilariozy podskórnej (22) i jeden przypadek inwazji podspojówkowej (21) wywołanej przez *D. repens*.

Wysoka ekstensywność inwazji dirofilarii stwierdzona w przeprowadzanych w naszym kraju badaniach u psów może powodować również wzrost zarażeń u ludzi.

## Piśmiennictwo

1. *Baneth G., Volansky Z., Anug Y., Favia G., Bain O., Goldstein R. E., Harrus S.*: *Dirofilaria repens* infection in a dog: diagnosis and treatment with melarsominae and doramectin. *Vet. Parasit.* 2002, 105, 173-178.
2. *Ben-Mahdi M., Madani M.*: Prevalence of canine *Dirofilaria immitis* infection in the city of Algiers, Algeria. *Afr. J. Agric. Res.* 2009, 4, 1097-1100.
3. *Demiaszkiewicz A. W., Polańczyk G.*: Pierwszy w Polsce przypadek inwazji *Dirofilaria repens* u psa. *Magazyn Wet.* 2010, 19, 254-256.
4. *Demiaszkiewicz A. W., Polańczyk G., Pyziel A. M., Kuligowska I., Lachowicz J.*: Pierwsze ogniska dirofilariozy psów wywołanej przez *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 w centralnej Polsce. *Wiad. Parazytol.* 2009, 55, 367-370.
5. *Fleck R., Kurz W., Quade B., Geginat G., Hof H.*: Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* mimicking a scrotal tumor. *Urology* 2009, 73, 209, e1-3.
6. *Genchi C., Rinaldi L., Mortarino M., Cringoli G.*: Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet. Parasit.* 2009, 163, 286-292.
7. *Kingston N., Morton J.*: *Trypanosoma cervi* sp. n. from elk (*Cervus canadensis*) in Wyoming. *J. Parasit.* 1975, 61, 17-23.
8. *Kuzmin Yu., Varodi E., Vasylyk N., Kononko G.*: Experimental infection of mosquitoes with *Dirofilaria repens* (Nematoda, Filarioidea) larvae. *Vest. Zool.* 2005, 39, 19-24.
9. *Lowenstein M., Spallinger E.*: First autochthonous case of canine *Dirofilaria*, (*Nochtiella*) *repens* infection in Austria – a case report. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 2009, 96, 184-187.
10. *Munichor M., Gold D., Lengy J., Linn R., Merzbach D.*: An unusual case of *Dirofilaria conjunctivae* infection suspected to be malignancy of the spermatic cord. *Israel Med. Ass. J.* 2001, 3, 860-861.
11. *Muro A., Genchi C., Cordero M., Simon F.*: Human dirofilariasis in the European Union. *Parasit. Today* 1999, 15, 386-389.
12. *Overgaauw P., van Dijk E.*: Autochthonous case of *Dirofilaria repens* in a dog in the Netherlands. *Vet. Rec.* 2009, 164, 158.
13. *Pampiglione S., Canestri Trotti G., Rivasi F.*: Human dirofilariasis due to *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens*: a review of world literature. *Parassitologia* 1995, 37, 149-193.
14. *Pampiglione S., Elek G., Palfi P., Vetesi F., Varga I.*: Human *Dirofilaria repens* infection in Hungary: a case in the spermatic cord and a revive of the literature. *Acta Vet. Hung.* 1999, 47, 77-83.
15. *Pampiglione S., Rivasi F., Angeli G., Boldorini R., Incensati R. M., Pastormerlo M., Pavesi M., Ramponi A.*: *Dirofilariasis* due to *Dirofilaria repens* in Italy, an Emergent zoonosis: report of 60 new cases. *Histopathology* 2001, 38, 344-354.
16. *Pantechev N., Norden N., Lorentzen L., Rossi M., Rossi U., Brand B., Dyachenko V.*: Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitol. Res.* 2009, 105, S63-S74.
17. *Sapierzyński R., Fabisiak M., Salamaszyńska A.*: Several cases of dirofilariosis accidentally diagnosed in dogs from Poland, including two PCR positive *Dirofilaria repens* cases. *Pol. J. Vet. Sci.* 2010, 13, 545-547.
18. *Svobodova V., Svobodova Z., Beladicova V., Valentova D.*: First cases of canine dirofilariasis in Slovakia: a case report. *Vet. Med. Praha* 2005, 50, 510-512.
19. *Svobodova Z., Svobodova V., Genchi C., Forejtek P.*: The first report of autochthonous dirofilariasis in dogs in the Czech Republic. *Helminthologia* 2006, 43, 242-245.
20. *Tarello W.*: Clinical aspects of dermatitis associated with *Dirofilaria repens* in pets: A review of 100 canine and 31 feline cases (1990-2010) and a report of a new clinic case imported from Italy to Dubai. *J. Parasitol. Res.* 2011, Article ID: 578385, 1-7.
21. *Wesołowska M., Kiszka K., Szaliński M., Zieliński M., Okulewicz A., Misiuk-Hojło M., Szostakowska B.*: First case of heterochthonous subconjunctival dirofilariasis described in Poland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010, 83, 210.
22. *Żarnowska-Prymek H., Cielecka D., Salamatin R.*: *Dirofilarioza* *Dirofilaria repens* – po raz pierwszy opisana u polskich pacjentów. *Przegl. Epidemiol.* 2008, 62, 547-551.

Adres autora: prof. dr hab. Aleksander W. Demiaszkiewicz, ul. Nowolipki 32 m. 33, 01-019 Warszawa; e-mail: [aldem@twarda.pan.pl](mailto:aldem@twarda.pan.pl)