

Zur Diagnose der Dirofilariose der Hunde

L. Srikitjakarn¹, N. Sinsuwong¹, Sasisopin Chailangkarn¹, Ch. Bunyapakorn¹, F. Hörchner²

Einleitung *Dirofilaria immitis* ist der Erreger einer der bedeutendsten und weitestverbreiteten Parasitose der Hunde und Katzen in den warmen Ländern. Die Herzwurmerkrankung tritt überall dort auf und kann autochthon werden, wo Durchschnittstemperaturen von mindestens 18°C über einen Zeitraum von 4 Wochen die Entwicklung der Mikrofilarien (MF) zu infektiösen Drittlarven in den Überträgern garantieren (1).

Eine Vielzahl verschiedener Mosquitoarten der weltweit verbreiteten Familie *Culicidae* können als Zwischenwirte fungieren (1, 5).

Das Auftreten von Dirofilariosefällen ist aber nicht nur auf Tropen und Subtropen beschränkt. Gerade in den Industrieländern wird der Hund immer häufiger als festes Mitglied in den Familienverband integriert und kommt damit auch in den Genuss, in die südlichen Urlaubsländer zu reisen. Durch Import von Hunden aus *Dirofilaria*-Regionen, vor allem aus den USA, erscheinen bei den praktizierenden Tierärzten in unseren Breiten immer häufiger Herzwurmpatienten.

Zur Diagnose der Dirofilariose wird neben dem direkten Erregernachweis (Mikrofilarien im Blut) vor allem in Endemiegebieten zusätzlich die Antigenserologie gefordert (2, 7, 9), da in diesen Regionen bei 5-15% der Herzwurmpatienten keine Mikrofilarien (MF) im Blut nachweisbar sind. Diese sogenannte okkulte Form ist ein noch nicht eindeutig geklärtes Phänomen, was auf eine erhöhte Immunitätslage der autochthonen Hundepopulation zurückgeführt wird (2, 10). Ob eventuell auch eine Periodizität des Auftretens von MF im Blut bei der Dirofilariose vorkommt, wie man es von verschiedensten Filarienarten kennt, ist häufig untersucht, aber nicht eindeutig definiert (11). Es könnten sogar regionale Unterschiede von Mikrofilariämien möglich sein, da die evolutionäre Adaptation des Erregers auf den Zwischenwirt auch vom Aktivitätsverhalten der jeweiligen Mosquitoarten abhängig ist. Für den Zeitpunkt einer diagnostischen Blutentnahme wäre die Kenntnis tageszeitlicher Schwankungen von MF-Peaks bei Hunden sicher zu berücksichtigen (11).

Da die meisten Patienten in unseren Praxen im Allgemeinen nicht aus Endemiegebieten stammen, wird zunächst der MF-Nachweis im Blut die Methode der Wahl sein, zumal der Antigen-Nachweis beim Hund höchstens 10-14 Tage vor dem ersten Auftreten von MF positiv werden soll (2, 3, 9). Bei einer Präpatenz von 6½-7 Monaten können klinische Erscheinungen gelegentlich schon 2-3 Monate früher auftreten. In jedem Fall sollte man aber bei Hunden aus Risikogebieten die lange Entwicklungszeit bei der eindeutigen Klärung der Diagnose berücksichtigen.

Für den MF-Nachweis werden folgende Standard-Methoden propagiert (2, 3, 4, 10):

- Dicker Tropfen auf Objektträger
- Modifizierter Knott-Test
- Filter-Test
- Mikrokapillar-Test oder Hämatokritzentrifugation Test (HCT)

Vorteil des Knott- und Filter-Tests ist die größere Menge verwendeten Blutes und damit eine höhere Ausbeute an MF (0,5-1,0 ml). Nachteil ist die Fixation der MF durch Fixativ- und Färbelösung und damit eine morphologische Veränderung. Außerdem sind beide Methoden arbeits- und zeitaufwendig. Deshalb verwendeten wir die modifizierte Knott-Technik und den Haemoatocrit-zentrifuge-test (HCT).

Material und Methoden

Im Rahmen eines Untersuchungsprogrammes über die Herzwurmerkrankung der Hunde in Nord-Thailand wurden im Zeitraum von Februar bis Oktober 2000 bisher über 350 Tiere untersucht. Bei den Hunden handelte es sich um die Klientel der Kleintierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Chiang Mai Universität sowie zweier Privatpraxen aus der Stadt bzw. einem Vorortbereich von Chiang Mai. Jeweils einmal wöchentlich wurden innerhalb eines bestimmten Zeitraumes allen vorgestellten Hunden im Alter ab 2 Monate Blut aus der Vena saphena in EDTA entnommen.

Für die Untersuchungen über die Periodizität der MF im peripherem Blut standen 10 natürlich infizierte Hunde zur Verfügung, denen über 72 Stunden im zweistündigen Abstand Blut entnommen wurde. Anschließend wurde ein Teil der Tiere mit T 61 euthanasiert und sezziert.

Für den Nachweis von MF wurden der modifizierte Knott-Test sowie der nach MURRAY modifizierte Woo-Test oder HCT eingesetzt (8).

Für den Knott-Test verwendeten wir je nach Blutmenge 0.5-1.0 ml EDTA-Blut verdünnt mit 9 ml Formalinlösung (2%). Anschließend wurde bei 800 g zentrifugiert und der Bodensatz von ca. 1 ml mit Methylenblau angefärbt auf den Objektträger verbracht.

Für den modifizierten Woo-Test verwendeten wir Mikrokapillare von 60 ml, die nach der Zentrifugation mit einem Glasschneider unterhalb des „Buffy Coats“ angeritzt, abgebrochen, und der weiße Blutpfropf zusammen mit dem Serum auf dem Objektträger aufgetragen wurde.

Ergebnisse

An insgesamt 351 Blutproben wurde vergleichsweise der Knott-Test und der Buffy Coat-Austrich der HCT untersucht. Wenn auch die Anzahl der MF im Knott-Test mit bis zu einer Zehnerpotenz höher lag – morphologisch aber schwer erkennbar –, so konnten 4 mal in einer Knott-Test-positiven Probe keine MF im Buffy Coat gefunden werden und umgekehrt 3 mal. Während die Sedimentmenge vom Knott-Test (bis zu 1,0 ml) einer wesentlich zeitaufwendigeren Untersuchung bedurfte, waren darüber hinaus bei einer nur geringen Mikrofilaraemie die toten und gestreckten MF teilweise schwierig zu identifizieren, in keinem Fall aber eine Spezies-Differenzierung möglich.

Die im Buffy Coat-Austrich befindlichen MF waren lebend, schnell in der Übersichtsvergrößerung erkenntlich und an Hand ihrer stationären „brezelartigen“ Bewegung leicht als *Dirofilaria* sp. zu definieren. Deshalb wurden auch wegen der etwas höheren Sensitivität alle späteren Untersuchungen ausschließlich mit der Buffy Coat-Austrich-Methode ausgeführt.

Bei den im Rahmen der Prävalenzermittlung durchgeführten Untersuchungen an bisher 351 Hunden aus der Region von Chiang Mai/Nordthailand zeigte sich, dass insgesamt bei 15,4% der Tiere MF im Blut festgestellt werden konnten. Berücksichtigt man aber die monatliche Prävalenzrate wird eine deutliche Abnahme der Mikrofilarien-träger im Zeitraum Juni - Oktober ersichtlich. Erstaunlicherweise waren von den ca. 50 weniger als 8 Monate alten Hunden ein 5, ein 6 und ein 8 Monate altes Jungtier positiv.

Sollte auch bei der *Dirofilaria immitis*-Infektion eine Periodizität der Mikrofilarien im Blut auftreten, wäre die Kenntnis darüber von erheblicher Bedeutung für die Verbesserung der Diagnostik. zehn natürlich infizierte Hunde wurden in 2 stündigem Abstand über jeweils 72 Stunden untersucht. Sechs der Tiere hatten über den gesamten Untersuchungszeitraum nur jeweils 1-3 MF im Ausstrich. Die 4 übrigen Hunde hatten im allgemeinen unterschiedliche MF-Zahlen im Blut, obwohl bei der Sektion dieser Tiere mit 18-20 *Dirofilaria*-Exemplaren kein großer Unterschied in der Wurmbürde bestand. Im Verlauf der jeweils 3 tägigen Untersuchung konnte aber bei keinem der Tiere jemals ein MF-negatives Ergebnis festgestellt werden. Allerdings zeigten sich Schwankungen in der Anzahl der MF, die auf ein vermehrtes Auftreten in den späten Nachmittags- und Abendstunden hinwiesen.

Diskussion Für den MF-Nachweis wird allgemein der modifizierte Knott-Test propagiert, der in seiner Sensibilität dem Filter-Test gegenüber sogar noch etwas überlegener eingestuft wird, da die MF in ihrer Morphologie nicht so stark deformiert sind (2, 3, 7). Allerdings ist die Methode wegen des Durchmusterens von ca. 0,5-1,0 ml Sediment ziemlich zeitaufwendig und die abgetöteten MF zeigen nicht mehr die charakteristische „brezelartige“ Bewegung im Gegensatz zu den ebenfalls verbreiteten *Dipetalonema*-Arten, die sich durchs Gesichtsfeld schlängeln.

Bei der Verwendung der HCT können die MF an der Grenze von Buffy Coat und Serum beobachtet werden. Zur Verbesserung der Diagnose von Mikrofilariämien vor allem bei Humanpatienten wurde auch der in der Malariadiagnostik propagierte Mikropapillartest verwendet, allerdings kann auch hier durch GIEMSA-Färbung keine Bewegungsdifferenzierung der Larven mehr vorgenommen werden (6).

Die ursprünglich für die Trypanosomen-Diagnostik eingeführte Woo-Technik wurde durch den Buffy Coat-Ausstrich in seiner Sensibilität ganz wesentlich verbessert (8). Das zeigte sich auch bei unseren Untersuchungen, denn mehrere im Knott-Test-negative Proben waren im Ausstrich positiv, während umgekehrt nur wenige Falsch-Negative zu verzeichnen waren. Zwar ist der Buffy Coat-Ausstrich der HCT (Murry-Test) keine quantitative Methode für den MF-Nachweis, im Hinblick auf die Wurmbürde ist es aber bedeutungslos, wie es in der Literatur wie auch in unseren Untersuchungen allgemein bestätigt werden konnte (1, 11). Der große Vorteil dieser Technik sind die rasche Diagnose und die Differenzierungsmöglichkeit zwischen einer Herzwurminfektion oder relativ harmlosen Filarien des subkutanen Bindegewebes, wie den *Dipetalonema*-Arten. Lediglich die MF von *D. repens* sehen morphologisch wie bewegungsmäßig den *D. immitis* sehr ähnlich und können nur durch eine aufwendige Enzymfärbung unterschieden werden. Da *D. repens* als kutikole Filarie aber deutliche Hautknoten verursacht, soll in jedem Fall bei Verdachtspatienten eine palpatorische Untersuchung vorgenommen werden.

Die Präpatenz bei *Dirofilaria immitis* wird nach experimentellen wie natürlichen Infektionen mit 6½ bis 7 Monaten angegeben (2, 11). Deshalb sollten Hunde erst ab einem Alter von 7-8 Monaten oder Tiere aus Risikogebieten erst nach Ablauf der angegebenen Entwicklungszeit auf MF untersucht werden (2). Wie sich aber aus unseren Ergebnissen zeigte, können schon ab dem 5-6 Monat MF bei Junghunden entdeckt werden. Ob eventuell bei Infektionen von Welpen die Präpatenz rascher ablaufen oder eine mögliche pränatale Infektion vorliegen kann, konnte in der Literatur nicht abgeklärt werden.

Bei negativen MF-Befunden von Herzwurm-verdächtigen Hunden, die aus einem Endemiegebiet abstammen, muss wegen des Vorliegens einer eventuellen okulten Dirofilariose an eine Antigen-serologie gedacht werden (2, 10).

Die Abnahme von Blutproben bei Herzwurm-verdächtigen Patienten sollte möglichst auf die späten Nachmittags- oder Abendstunden verlegt werden. Eine eindeutige Periodizität von MF im peripherem Blut bei *Dirofilaria*-Patienten ist weder in der Literatur (11) dokumentiert noch in unseren über 3 Tage durchgeführten Untersuchungen an natürlich-infizierten Tieren nachzuweisen gewesen. Allerdings zeigte sich ein deutlicher Anstieg von MF von den Nachmittagsstunden bis in die Nachtstunden.

Zusammenfassung Im Rahmen von Prävalenzuntersuchungen zur Situation der Herzwurmerkrankung wurden bisher 351 Blutproben von Hunde aus städtischen wie ländlichen Bereichen Nordthailands untersucht. 15,4% der Tiere zeigten Mikrofilarien (MF) von *Dirofilaria* sp. Allerdings war in dem bisherigen 8-monatigen Untersuchungszeitraum eine deutliche Schwankung der monatlichen Prävalenzrate zu erkennen. Bei keinem der untersuchten Hunde konnten palpatorisch Hautbeulen bzw. der Verdacht von *Dirofilaria repens* festgestellt werden. Entgegen den Angaben aus der Literatur zeigten bereits ein 5 und ein 6 Monate alter Welpe *Dirofilaria*-MF im Blut. Zur Diagnose der MF wurden vergleichsweise der modifizierte Knott-Test (Methylen Blau-angefärbtes Sediment von 0,5-1,0 ml Blut lysiert mit 9,0 ml einer 2% Formalinlösung) und der modifizierten Hämatokrit Zentrifugationstechnik nach MURRY (Buffy Coat-Ausstrich) verwendet. Wenn auch im Knott-Test die Anzahl der MF um bis zu einer Zehnerpotenzen höher lag, so konnten bei den vergleichsweise untersuchten Proben im Buffy Coat-Ausstrich mehr positive Fälle festgestellt werden. Der Buffy Coat-Austrich ist dem Knott-Test überlegen, da er schnell durchführbar ist und wegen der typischen Bewegung der MF eine klare Differenzierung zwischen *Dirofilaria* und den harmlosen Hautfilarien (*Dipetalonema*) zulässt.

Bei Untersuchungen an 10 natürlich-infizierten Hunden in 2-stündigem Abstand über 3 Tage zeigte sich keine eindeutige Periodizität der MF im peripheren Blut, jedoch tritt ein deutlicher Anstieg von MF in den späten Nachmittags- und Abendstunden auf.

Schlüsselwörter Dirofilariose-Diagnose, Hund, Buffy Coat-Ausstrich, MF-Periodizität

Summary *On diagnosis of canine Dirofilaria immitis-Infection of North Tailand*

Within a prevalence study on the canine heartworm situation in the north of Thailand a total of 351 blood samples of dogs were investigated from Februar to October 2000. Although the infection rate of *Dirofilaria immitis* exhibited 15,4% related to microfilaraemia, the monthly prevalence varied considerably. All dogs were skin palpated, in no one case subcutaneous nodules could be observed. Contrary to literature in a 5 and a 6 months old puppy MF in the blood were detected. For diagnosing MF the modified Knott test and the modified HCT (buffy coat smear) were used. Although the number of MF were 10 times more by the Knott test, the buffy coat smear exhibited a higher sensitivity and alive MF could be differentiated between *Dirofilaria* sp. and *Dipetalonema* sp.

Concerning the periodicity of microfilaraemia 10 naturally heartworm infected dogs were investigated in two hours intervals within 3 days. No amicrofilaraemic period were observed, but in the late afternoon and early evening the number of MF rose in the peripheral blood.

Key words Diagnosis of canine dirofilariosis, buffy coat smear, periodicity of MF.

Literatur

1. ABRAHAM, D. (1988):
Biology of *Dirofilaria immitis*
In: Boreham ,P. F. L. and R. B. Atwell: *Dirofilariasis*,
CRC Press, Bocca Raton, Florida
2. AMERICAN HEARTWORM SOCIETY (1997):
Procedures for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs
Canine Practice 22, 8 - 15
3. ATWELL, R. B. (1988):
Clinical signs and diagnosis of canine dirofilariasis
In: Boreham, P.F.L. and R. B. ATWELL: *Dirofilariasis*.
CRC Press, Bocca Raton, Florida
4. BARRIGA, O. O. (1997):
Veterinary parasitology for practitioners
Burgess International Group, USA, 2. ed. C. 20.20 - 20.21
5. GREGORI, J. R. and GREGORI, Marion, E. (1992):
Canine clinical parasitology
Lea&Febiger, London, S. 194 - 199
6. LIANG-CHEN WANG (1998):
Evaluation of quantitative buffy coat analysis in the detection of canine *Dirofilaria immitis* infection: a model to determine its effectiveness in the diagnosis of human filariasis
Parasitol. Res. 84, 246 - 248
7. KNIGHT, D. (2000):
Guidelines for diagnosis and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection.
In: *Kirks current veterinary therapy XIII, small animal practice* (ed. Bonagura)
I. D. W. B. Saunders, Philadelphia, S. 879 - 889
8. MURRAY, M. (1977):
An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 71. 325 - 326
9. MING M. WONG (1986):
Immunology, immunopathology, and immunoprophylaxis of *Dirofilaria immitis*.
In: *Immune responses in parasitic infections*, Vol. I, S. 251 - 280
CRC Press, Bocca Raton, Florida
10. POLIZOPOULOU, Z. S. et al. (2000):
Clinical and laboratory observations in 91 dogs infected with *Dirofilaria immitis* in northern Greece.
Veterinary Record, 146, 466 - 468
11. SCHREY, C. F. (1996):
Epidemiologische Fallanalyse und Klinik der kardiovaskulären *Dirofilariose*
(Herzwurmerkrankung) bei Hunden in Deutschland.
Vet. Med. Diss. FU Berlin

Korrespondenzadresse Prof. Dr. F. Hörchner
Inst. Parasitologie/Tropenveterinärmedizin, FU Berlin
Königsweg 67
D 14163 Berlin

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 2001

Band/Volume: [23](#)

Autor(en)/Author(s): Srikitjakarn L., Sinsuwong N., Chailangkarn Sasisopin, Bunyapakorn Ch., Hörchner Franz

Artikel/Article: [Zur Diagnose der Diroßlariose der Hunde. 45-50](#)