

Биохимия, биотехнология и диагностика

УДК 619:616.995.1-07

DOI:

Поступила в редакцию: 24.02.2016

Принята в печать: 01.05.2016

Для цитирования:

Бережко В.К., Хайдаров К.А., Написанова Л.А., Тхакахова А.А. Половозрелые паразиты крупного рогатого скота – *Setaria labiato-papillosa* – источник получения диагностического антигена при диروفилариозе (*Dirofilaria immitis*). // *Российский паразитологический журнал*. – М., 2016. – Т.36. – Вып.2. – С.

For citation:

Berezhko, V. K., Khaidarov K. A., Napisanova L. A., Thakahova A. A. Mature *Setaria labiato-papillosa* in cattle - a source for receiving antigens for diagnosis of dirofilariasis (*Dirofilaria immitis*). *Russian Journal of Parasitology*, 2016, V.36, Iss.2, pp.

MATURE SETARIA LABIATO-PAPILLOSA IN CATTLE – A SOURCE FOR RECEIVING ANTIGENS FOR DIAGNOSIS OF DIROFILARIASIS (DIROFILARIA IMMITIS)

ПОЛОВОЗРЕЛЫЕ ПАРАЗИТЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА – SETARIA LABIATO-PAPILLOSA – ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО АНТИГЕНА ПРИ ДИРОФИЛЯРИОЗЕ (DIROFILARIA IMMITIS)

Бережко В.К., Хайдаров К.А., Написанова Л.А., Тхакахова А.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К. И. Скрябина 117218, Россия, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28, e-mail: berejko@vniigis.ru, napisanova@vniigis.ru, amina7161@yandex.ru

Реферат

Цель работы – оценка диагностической эффективности фракционированного антигена из половозрелых паразитов крупного рогатого скота – *Setaria labiato-papillosa* при диروفилариозе (*Dirofilaria immitis*).

Материалы и методы – антиген из половозрелых гельминтов *S. labiato-papillosa*, референс сыворотки инвазированных и не инвазированных собак. Реакция иммунодиффузии (РИД) в агаровом геле с использованием референс сывороток собак, инвазированных *D. immitis*, и антигенов-экстрактов из *S. labiato-papillosa* и *D. immitis*. Метод гель-хроматографии на колонке Pharmacia, заполненной Superose 12 Prep Grade, и иммуноферментная реакция (ИФР).

Результаты и обсуждение – методом РИД установили перекрестно-реагирующие антигенные компоненты у *D. immitis* и *S. labiato-papillosa*. Методом фракционирования антигена из *S. labiato-papillosa* получено 40 белковых фракций, из которых 7 (17,5%) представляли интерес в диагностике диروفилариоза. Диагностическая оценка этих фракций при диروفилариозе проведена ИФР с 47 пробами сывороток собак, в том числе 11 проб с инвазией *D. immitis*; 6 – *D. repens*; 3 – *Babesia canis*; 3 – *Toxocara canis*; 9 – с непаразитарной

патологией и 15 клинически здоровых. Результаты этого анализа показали, что из 11 проб сывороток крови собак, инвазированных *D. immitis*, в одной регистрировали ложноотрицательный ответ, а из 6 – с *D. repens* – в двух. Чувствительность теста составила 82,4%, специфичность – 83,3%. Аналогичный анализ этих сывороток, проведенный с очищенным антигеном-экстрактом из половозрелых *D. immitis*, показал чувствительность также 82,4%, а специфичность – 86,7%. Сопоставимость полученных результатов в диагностике дирофиляриоза ИФР с антигенными препаратами из сетарий и дирофилярий позволяет сделать заключение о возможности использования *S. labiato-papillosa* в качестве источника диагностического антигена при дирофиляриозе (*D. immitis*).

Ключевые слова: *Setaria labiato-papillosa*, *Dirofilaria immitis*, крупный рогатый скот, сыворотки собак, фракционированный антиген, иммуноферментная реакция.

Введение

За последние годы произошло значительное расширение ареала распространения дирофилярий, что привело к росту заболеваемости человека и животных дирофиляриозом и явилось следствием неослабевающего научного интереса к изучению этой медико-ветеринарной проблемы [6-10, 12, 19, 20].

Прижизненная диагностика дирофиляриоза, возбудителями которой являются *D. immitis* и *D. repens*, как правило, базируется на обнаружении микрофилярий в крови и их идентификации. Но поскольку дирофиляриоз продолжительное время может протекать бессимптомно, особенно при низкой интенсивности инвазии и соответственно низкой микрофиляриемии, то эти методы фактически не дают должного эффекта.

В таких случаях особый смысл приобретают исследования по разработке и использованию иммунодиагностических тестов, основу которых составляет выявление циркулирующих антигенов или антител, синтезируемых в организме инвазированного животного или человека.

Достаточно привлекательным при низкой микрофиляриемии и латентной форме инвазии является метод ПЦР с видоспецифическими праймерами для *D. immitis* и *D. repens*, позволяющий дифференцировать инвазию [4, 16, 17, 22]. Несомненно, эффективность иммунодиагностических тестов зависит не только от уровня синтезируемых в процессе заражения антител и поступающих в кровяное русло антигенов паразита, но и от качества используемых в реакциях антигенных препаратов, среди которых наибольшее применение находят экскреторно-секреторные, цельные или фракционированные соматические экстракты из половозрелых паразитов и микрофилярий [3, 5-7, 23].

В связи с тем, что приобретение достаточного количества половозрелых дирофилярий и микрофилярий для приготовления антигена не всегда представляется возможным, нами была предпринята попытка найти подходящий гетерологичный объект среди более доступных и распространенных гельминтов сельскохозяйственных животных, которые могли иметь общие с дирофиляриями антигенные компоненты диагностического значения. Идея такого подхода базируется на экспериментально доказанном еще в 70-е годы прошлого столетия серологическом родстве между различными видами гельминтов, зависящих от их токсонамической удаленности [14].

Исходя из этого нами в качестве гетерологичного объекта была выбрана нематода *Setaria labiato-papillosa* – паразит крупного рогатого скота, которая, как и *D. immitis*, относится к подотряду *Filariata* и в белковом спектре может иметь компоненты диагностического значения при дирофиляриозе.

Цель нашей работы заключалась в определении и выделении из соматического экстракта половозрелых *S. labiato-papillosa* антигенных компонентов для диагностики дирофиляриоза.

Материалы и методы

Объектами исследования служили половозрелые сетарии, выделенные от инвазированного крупного рогатого скота на убойных пунктах Украины и Кабардино-

Балкарской Республики и половозрелые дирофилярии (*D. immitis*), полученные от зараженных собак в Краснодарском крае и Волгоградской области.

Соматические экстракты из этих паразитов (каждый в отдельности) готовили по методу В.К. Бережко с соавторами [2]. В полученных экстрактах определяли содержание белка на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 280 нм с калибровочной кривой на основании 5-й фракции бычьего сывороточного альбумина. Материалом исследования были также референс положительные сыворотки крови инвазированных *D. immitis* собак; референс отрицательные сыворотки крови клинически здоровых собак и с гетерологичной инвазией.

Наличие в белковом экстракте из сетарий антигенных компонентов, идентичных диагностическим при дирофиляриозе, устанавливали реакцией иммунодиффузии (РИД) в агаровом геле [11] в варианте “четверка”, где верхнюю лунку заполняли антигеном-экстрактом из сетарий; правую нижнюю – антигеном-экстрактом из дирофилярий (*D. immitis*); левую нижнюю – физиологическим раствором; центральную – референс сывороткой собак, зараженных *D. immitis*.

Учитывая, что соматический экстракт из сетарий является гетерологичным антигенным материалом для повышения его диагностического качества при дирофиляриозе была проведена очистка гелехроматографией на колонке «Pharmacia», размером 16×70 мм [3].

Аналогичной процедуре подвергли гомологичный экстракт, приготовленный из половозрелых *D. immitis*. Фракции собирали по 3 мл в пробирки, содержание белка в них контролировали на детекторе Uvicord S II, ABS –Range – 0,5 (Pharmacia). Антигенную активность и диагностическую эффективность полученных фракций определяли иммуноферментной реакцией (ИФР) с использованием референс положительных и отрицательных контрольных сывороток собак.

Диагностически значимые при дирофиляриозе белковые фракции соматического экстракта из сетарий объединили и исследовали в ИФР с 47 пробами сывороток крови собак, в том числе 11 проб с естественной инвазией *D. immitis*; 6 – *D. repens*; 3 – *Babesia canis*; 3 – *Toxocara canis*; 9 – с непаразитарной патологией и 15 – клинически здоровых животных. С этими же сыворотками для сравнения провели анализ в ИФР аналогичных белковых фракций, выделенных после фракционирования экстракта из половозрелых *D. immitis*.

Результаты и их обсуждение

Анализ соматических экстрактов из сетарий и дирофилярий в РИД с референс положительной контрольной сывороткой собак, инвазированных *D. immitis*, четко показал наличие у этих паразитов перекрестно-реагирующих антигенных компонентов. В обоих случаях как в гомологичной, так и в гетерологичной системе реакции регистрировали одну полосу преципитации несколько диффузного характера. Вполне возможно, что диффузность проявившейся полосы преципитации является следствием использования в реакции неочищенных соматических экстрактов из половозрелых сетарий и дирофилярий, не отличающихся гомогенностью и содержащих антигенные компоненты различной молекулярной массы, активности и специфичности.

Тем не менее полученный положительный результат является доказательством того, что соматический экстракт из половозрелых сетарий имеет в своем составе диагностически значимые компоненты при дирофиляриозе. С учетом этого факта последующая работа была направлена на выделение из этого экстракта диагностически активных при дирофиляриозе антигенных компонентов и оценке их чувствительности и специфичности в ИФР при дирофиляриозе.

Для определения диагностически эффективных белковых компонентов в соматическом экстракте из половозрелых сетарий было проведено его фракционирование методом гелехроматографии, позволившее получить 40 белковых фракций с различным содержанием белка и антигенной активности (табл. 1). Антигенную активность белковых фракций оценивали в ИФР по разнице оптической плотности (ОП) между референс положительной и отрицательной контрольной сывороткой крови собак.

Представленные в таблице данные показали, что в 11 (27,5%) белковых фракциях разница в ОП между контрольными сыворотками в ИФР была минимальной и составила от 0,001 до 0,064. Эти фракции не могли иметь диагностического значения, поскольку при такой разнице в показателях ОП дифференцировать больных и здоровых животных практически невозможно. В 22 (55,0%) белковых фракциях не регистрировали антигенные компоненты, способные распознавать сывороточные антитела класса IgG у больных дирофиляриозом животных. Такое заключение вытекало из показателей ОП в ИФР с контрольными сыворотками, а именно разница показателей ОП между референс отрицательной и положительной контрольной сывороткой крови собак была нулевой и даже отрицательной (табл. 1).

Из общего числа исследованных фракций в ИФР только 7 (17,5%), судя по разнице ОП (от 0,150 до 0,388) между контрольными сыворотками, могли представлять интерес для дальнейших испытаний. Однако, несмотря на то, что в этих белковых фракциях были определены антигенные компоненты, имеющие диагностическое значение при дирофиляриозе, необходимо было охарактеризовать их в плане специфичности, используя для этой цели сыворотки крови собак, инвазированных другими гельминтами. С другой стороны, необходимо было сравнить полученные данные с аналогичными исследованиями при тех же условиях с фракционированным экстрактом из половозрелых *D. immitis*.

При оценке диагностической эффективности выделенных фракций из соматического экстракта сетарий в ИФР при дирофиляриозе установили, что из 11 проб сывороток крови инвазированных *D. immitis* собак в одной регистрировали ложноотрицательный результат (табл. 2). В этом случае чувствительность теста составила 90,9%. Аналогичный анализ этих фракций с 6 сыворотками собак с инвазией *D. repens* показал в 2 пробах ложноотрицательный ответ, что соответствует чувствительности 66,7%. Такой результат вполне оправдан, поскольку отбор антигеноактивных белковых фракций в экстракте из сетарий проводили на основании ИФР с референс сыворотками собак, зараженных *D. immitis*, а не *D. repens*. Чувствительность теста при учете результатов реакции с сыворотками собак обеих групп составила 82,4% (табл. 2).

Аналогичный анализ, проведенный этой же реакцией с фракционированным соматическим экстрактом из половозрелых *D. immitis* с использованием этих же сывороток, показал такую же чувствительность теста (табл. 2).

Анализ 30 проб сывороток собак с гетерологичной инвазией (бабезиоз, токсокароз), непаразитарной патологией и клинически здоровых, использованных для оценки специфичности иммунотеста, показал с антигеном из сетарий – 5, а из дирофилярий – 4 ложноположительных результатов. Исходя из этих данных специфичность ИФР составила соответственно 83,3% и 86,7% (табл. 2).

Сопоставимость полученных в обоих случаях результатов является убедительным доказательством того, что фракционированный соматический экстракт из половозрелых сетарий вполне может использоваться в качестве источника диагностического антигена при дирофиляриозе (*D. immitis*).

Наши результаты согласуются с сероэпизоотологическими и сероэпидемиологическими исследованиями при дирофиляриозе на основе ИФР с антигенными препаратами из дирофилярий, полученных разными технологическими приемами [4, 6, 7, 23]

Развитие иммунодиагностических исследований при дирофиляриозе, как, впрочем, и при других гельминтозах происходит в двух направлениях, а именно в разработке более простых в исполнении и эффективных иммунотестов и в применении более специфичных антигенов возбудителей. С этих позиций для индивидуального и группового исследования собак на дирофиляриоз достаточно часто используют тесты, основанные на выявлении циркулирующих антигенов [13, 18, 24], хотя, по некоторым данным, инвазия в этом случае выявляется непостоянно, а только при наличии в организме инвазированного животного от трех и более половозрелых самок.

Таблица 1

Антигенная активность белковых фракций соматического экстракта из половозрелых *Setaria labiato-papillosa* в ИФР

Номер а фракций	Оптическая плотность в ИФР		
	Положительный контроль* (+)	Отрицательный контроль** (-)	Разница между «+» и «-»
1	0,133	0,124	0,009
2	0,639	0,251	0,388
3	0,537	0,245	0,292
4	0,668	0,309	0,359
5	0,562	0,306	0,256
6	0,535	0,240	0,295
7	0,528	0,303	0,226
8	0,479	0,328	0,151
9	0,360	0,296	0,064
10	0,311	0,296	0,015
11	0,217	0,247	-0,003
12	0,213	0,262	-0,049
13	0,224	0,278	-0,054
14	0,202	0,206	-0,004
15	0,171	0,184	-0,012
16	0,135	0,161	-0,025
17	0,123	0,138	-0,015
18	0,113	0,131	-0,018
19	0,169	0,143	0,026
20	0,175	0,132	0,043
21	0,169	0,150	0,019
22	0,128	0,131	-0,002
23	0,100	0,228	-0,128
24	0,147	0,135	0,012
25	0,143	0,172	-0,029
26	0,193	0,186	0,007
27	0,122	0,132	-0,010
28	0,095	0,100	-0,005
29	0,136	0,186	-0,050
30	0,141	0,161	-0,019
31	0,144	0,146	-0,002
32	0,116	0,133	-0,017
33	0,138	0,171	-0,033
34	0,146	0,158	-0,012
35	0,140	0,159	-0,019
36	0,103	0,101	0,002
37	0,185	0,184	0,001
38	0,121	0,143	-0,022
39	0,115	0,089	0,026
40	0,086	0,087	-0,001

* Положительный контроль – референс сывороток, зараженных *D. immitis* собак

** Отрицательный контроль – референс сывороток клинически здоровых собак

Таблица 2

Диагностическая эффективность ИФР с соматическими фракционированными антигенами из сетарий (*S. labiato-papillosa*) и дирофилярий (*D. immitis*) при дирофиляриозе собак

Инвазии	Количество проб	Результаты ИФР							
		С антигеном из сетарий				С антигеном из дирофилярий			
		Положительный (+)	Отрицательный (-)	Чувствительность, %	Специфичность, %	Положительный (+)	Отрицательный (-)	Чувствительность, %	Специфичность, %
Дирофиляриоз (<i>D. immitis</i>)	1	0	1	0,9	3,3	0	1	0,9	6,7
Дирофиляриоз (<i>D. repens</i>)	6	4	0			0			
<i>Babesia canis</i>	3	1	0			0			
<i>Toxocara canis</i>	3	1	0			0			
8непаразитарная 12патология	9	2	0			0			
клинически здоровые	5	3	2			2			

* При учете результатов ИФР с сыворотками собак обеих групп чувствительность составила 82,4%.

Безусловным условием высокой эффективности иммунотестов, основанных на выявлении антител, является качество используемых антигенов. Как правило, цельные белковые экстракты не позволяют достичь желаемого результата, поэтому в большинстве случаев исследователи прибегают к различным приемам по их очистке и выделению диагностически значимых антигеноактивных компонентов, позволяющих в определенной степени повысить показатели чувствительности и специфичности.

С другой стороны, с учетом значительного антигенного родства гельминтов разных видов, расширяются возможности поиска таких антигенов, особенно в тех случаях, когда возникают трудности в приобретении гомологичного биоматериала. Сходство части антигенных компонентов у разных видов гельминтов, как это мы установили в РИД между *D. immitis* и *S. labiato-papillosa*, свидетельствует об общности некоторой части биоструктур этих паразитов и является отображением их филогенетического развития. Появление различий антигенов рассматривается как антигенный полиморфизм, который может быть обусловлен различием среды их обитания, т.е. хозяев. Одним из индуцированных факторов для гельминтов является среда организма хозяина, в которой он развивается и функционирует. При этом приспособленность определенного вида паразита к определенным видам хозяев является ничем иным, как приобретенным в процессе эволюции свойством организма паразита приспособляться к защитным реакциям хозяина [1, 21].

Антигенные различия между близкими видами можно считать следствием популяционной изменчивости, не имеющей таксономического значения видового и подвидового ранга. Возможно, что это не что иное как иммунологические признаки популяций.

Эволюция должна неизбежно вести селекцию в направлении того, чтобы антигены вновь возникающих видов паразитов были подобны антигенам хозяев, чтобы становиться «невидимыми» и не распознаваться иммунной системой хозяина как «чужеродные». Именно этим можно объяснить тот факт, что в организме специфичного хозяина антигенный потенциал паразита проявляется слабее и число антигеноактивных компонентов, стимулирующих синтез антител в процессе паразитирования, является минимальным. В этой связи наблюдаются характерные различия иммунной реакции как в количественном, так и в качественном отношении в различных хозяино-паразитных системах.

Заключение

Исходя из полученных данных считаем вполне логичным при необходимости использовать в иммуноисследованиях антигенный материал, полученный из гетерологичного вида паразита, если он соответствует критериям чувствительности и специфичности.

Литература

1. Астафьев Б.А., Петров О.Е. Эволюционно-генетическая теория паразитизма // Успехи современной биологии – 1992. – т. 112, №2. – С. 163-175.
2. Бережко В.К., Хайдаров В.К., Дахно Н.С., Шкурка Е.П. Иммунохимический анализ соматического экстракта из половозрелых *Dirofilaria immitis*. // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: материалы докладов научной конференции ВИГИС – 2008. – вып. 9. – С. 69-73.
3. Бережко В.К., Написанова Л.А., Медведев А.Ю., Хайдаров К.А., Шинкаренко А.Н., Колесников П.В. Физико-химическая и иммунодиагностическая характеристика цельного и фракционированного соматического экстракта *Dirofilaria immitis*. // Доклады Россельхозакадемии. – 2014. – №1. – С.71-74.
4. Бескровная Ю.Г., Нагорный С.А. Идентификация микрофилярий *Dirofilaria spp.* с помощью ПЦР. // Матер. докл. неуч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» – М. – 2008. – С. 73 -75.
5. Бескровная Ю.Г., Нагорный С.А., Васерин Ю.И. Оценка эффективности диагностики дирофиляриоза у собак с использованием соматического антигена *Dirofilaria repens*. // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: материалы докладов научной конференции ВИГИС – 2009. – вып. 10. – С. 61-63.
6. Криворотова Е.Ю. Биологические аспекты дирофиляриоза в ряде субъектов Российской Федерации. // Дис. ... кандидата биологических наук. – 03.02.11. – Москва. – 2015. – 141С.
7. Медведев А.Ю. Распространение дирофиляриоз собак в Краснодарском крае и разработка его диагностики иммуноферментной реакцией. // Дис. ... кандидата биологических наук. – 03.02.11. – Москва –2007 – С.137.
8. Сергиев В.П., Супряга В.Г., Дарченкова Н.Н., Жукова Л.А., Иванова Т.Н. Дирофиляриоз человека в России. // Российский паразитологический журнал. – 2012. – № 4. – С. 60-64.
9. Сергиев В.П., Супряга В.Г., Бронштейн А.М., Ганушкина Л.А., Ракова В.М., Морозов Е.Н., Федянина Л.В., Фролова А.А., Морозова Л.Ф., Иванова И.Б., Дарченкова Н.Н., Жукова Л.А. Итоги изучения дирофиляриоза человека в России. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 2014. – № 3. – С. 3-9.
10. Фисько М.А., Фирсов Н.Ф. Дирофиляриоз. // – Ростов н/Д, 2006. – 110 С.
11. Хайдаров К.А., Бережко В.К. Антигенный спектр соматических экстрактов из половозрелых сетарий и дирофилярий. // Российский паразитологический журнал. – 2009 – №1. – С. 68–74.
12. Akae N. Human dirofilariasis in Japan. // Trop Med Health. – 2011. – Vol. 39, N 1. Suppl 2. – P. 65-71.

13. Atwell R.B., Sheridan A.B., Baldock F.C. An evaluation of the Dirochek test for detection of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. // *Aust. Vet. J.* – 1988. – Vol. 65, N 5. – P. 161-162.
14. Capron A., Brygoo E.R., Afchain D. Apport de letude de la structure antigenique a la phylogenie des Helminthes. // *Bull. Mus. Nat. hist. natur. Zoo.* – 1972 – Vol. 55–p. 877-885.
15. Collins G.H., Pope S.E. An evaluation of an ELISA test for the detection of antigens of *Dirofilaria immitis*. // *Aust. Vet. J.* – 1987. – Vol. 64, N 10. – P. 318-319.
16. Gioia G., Lecová L., Genchi M. et al. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. // *Vet. Parasitol.* – 2010. – Vol. 172, N 1-2. – P. 160-163.
17. Latrofa M.S., Dantas-Torres F., Annoscia G. et al. A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. // *Vet. Parasitol.* – 2012. – Vol. 185, N 2-4. – P. 181-185.
18. Lee A.C., Bowman D.D., Lucio-Forster A. et al. Evaluation of a new in-clinic method for the detection of canine heartworm antigen. // *Vet. Parasitol.* – 2011. – Vol. 177, N 3-4. – P. 387-391.
19. Mc Call J.W., Genchi C., Kramer L.H. et al. Heartworm disease in animals and humans. // *Adv. Parasitol.* – 2008. – Vol. 66. – P. 193-285.
20. Morchón R., Carretón E., González-Miguel J., Mellado-Hernández I. Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe - New Distribution Trends. // *Front. Physiol.* – 2012. – Vol. 3. – Article 196.
21. Renaud F. Biodiversite, genetiqueet evolution dans les systemes hotes-parasites. // *Bull. Soc. Zool. Ff.* – 1992. – V. 117. – N 1–P. 109-115.
22. Rivasi F., Boldorini R., Criante P. et al. Detection of *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens* DNA by polymerase chain reaction in embedded paraffin tissues from two human pulmonary locations. // *APMIS.* – 2006. – Vol. 114, N 7-8. – P. 567-574.
23. Sun M., Zhuo W., Guo S. et al. Serological survey of canine dirofilariosis in Chongqing, Kunming, Nanchang, Fuzhou, Guangzhou, Shenzhen, and Nanning in Southern China. // *Vet. Parasitol.* – 2012. – Vol. 185, N 2-4. – P. 225-228.
24. Weil G.J., Malane M.S, Powers K.G. Detection of circulating parasite antigens in canine dirofilariosis by counterimmunoelectrophoresis. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1984. – Vol. 33, N 3. – P. 425-430.

References

1. Astaf'ev B.A., Petrov O.E. Evolutionary and genetic theory of parasitism. *Uspehi sovremennoj biologii* [Advances in modern biology], 1992, vol.112, no. 2, pp. 163-175. (In Russian)
2. Berezhko V.K., Khaydarov V.K., Dahno N.S., Shkurka E.P. Immunochemical analysis of somatic extract from mature *Dirofilaria immitis*. *Mater. dokl. nauch. konf. Vseros. o-va gel'mintol. RAN «Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami»*. [Proc. of sci. conf. of All-Russian Society of Helminthol. RAS «Theory and practice of the struggle against parasitic diseases]. M., 2008, i. 9, pp. 69-73. (In Russian)
3. Berezhko V.K., Napisanova L.A., Medvedev A.Yu., Khaydarov K.A., Shinkarenko A.N., Kolesnikov P.V. *Physicochemical and immunodiagnostic characteristics of whole and fractionated somatic extract of Dirofilaria immitis. Doklady Rossel'hozakademii*. [Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences], 2014, no. 1, pp. 71-74. (In Russian)
4. Beskrovnaya Yu.G., Nagornyi S.A. Identification of microfilaria *Dirofilaria* spp. by polymerase chain reaction (PCR). *Mater. dokl. nauch. konf. Vseros. o-va gel'mintol. RAN «Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami»*. [Proc. of sci. conf. of All-Russian Society of Helminthol., RAS «Theory and practice of the struggle against parasitic diseases]. M., 2008, pp. 73-75. (In Russian)

5. Beskrovnaya Ju.G., Nagornyi S.A., Vaserin Yu.I. Efficacy evaluation of diagnosis of dirofilariasis in dogs using the *Dirofilaria repens* somatic antigen. *Mater. dokl. nauch. konf. Vseros. o-va gel'mintol. RAN «Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami»*. [Proc. of sci. conf. of All-Russian Society of Helminthol., RAS «Theory and practice of the struggle against parasitic diseases]. M., 2009, i. 10, pp. 61-63. (In Russian)
6. Krivorotova E.Yu. *Biologicheskie aspekty dirofilyarioza v ryade sub'ektov Rossiyskoy Federatsii. Dis. ... kand. biol. nauk* [Biological aspects of dirofilariasis in a number of constituent territories of the Russian Federation. PhD diss... biol. sci.]. M., 2015. 141 p. (In Russian)
7. Medvedev A.Yu. *Rasprostranenie dirofilyarioza sobak v Krasnodarskom krae i razrabotka ego diagnostiki immunofermentnoy reakciey. Diss. ... kand. Boil. nauk* [Prevalence of dirofilariasis in dogs in Krasnodar Krai and development of diagnostic techniques using an immunoenzymatic reaction. PhD diss... biol. sci.]. M., 2007. 137 p. (In Russian)
8. Sergiev V.P., Supryaga V.G., Darchenkova N.N., Zhukova L.A., Ivanova T.N. Human dirofilariasis in Russia. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal* [Russian Journal of Parasitology], 2012, no. 4, pp. 60-64. (In Russian)
9. Sergiev V.P., Supryaga V.G., Bronshtein A.M., Ganushkina L.A., Rakova V.M., Morozov E.N., Fedyanina L.V., Frolova A.A., Morozova L.F., Ivanova I.B., Darchenkova N.N., Zhukova L.A. Results of the study on dirofilariasis in Russia. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni* [Medical Parasitology and Parasitic Diseases], 2014, no. 3, pp. 3-9. (In Russian)
10. Fis'ko M.A., Firsov N.F. *Dirofilyarioz* [Dirofilariasis], Rostov-on-Don, 2006. 110 p. (In Russian)
11. Khaydarov K.A., Berezhko V.K. Antigenic spectrum of somatic extracts from mature *Setaria* and *Dirofilaria*. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal* [Russian Journal of Parasitology], 2009, no 1, pp. 68-74. (In Russian)
12. Akao N. Human dirofilariasis in Japan. *Trop Med Health*, 2011, vol. 39, no. 1. Suppl. 2, pp. 65-71.
13. Atwell R.B., Sheridan A.B., Baldock F.C. An evaluation of the *Dirochek* test for detection of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Aust. Vet. J.*, 1988, vol. 65, no. 5, pp. 161-162.
14. Capron A., Brygoo E.R., Afchain D. Apport de letude de la structure antigenique a la phylogenie des Helminthes. *Bull. Mus. Nat. hist. natur. Zoo*, 1972, vol. 55, pp. 877-885.
15. Collins G.H., Pope S.E. An evaluation of an ELISA test for the detection of antigens of *Dirofilaria immitis*. *Aust. Vet. J.*, 1987, vol. 64, no. 10, pp. 318-319.
16. Gioia G., Lecová L., Genchi M. et al. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Vet. Parasitol.*, 2010, vol. 172, no. 1-2, pp. 160-163.
17. Latrofa M.S., Dantas-Torres F., Annoscia G. et al. A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. *Vet. Parasitol.*, 2012, vol. 185, no. 2-4, pp. 181-185.
18. Lee A.C., Bowman D.D., Lucio-Forster A. et al. Evaluation of a new in-clinic method for the detection of canine heartworm antigen. *Vet. Parasitol.*, 2011, vol. 177, no. 3-4, pp. 387-391.
19. Mc Call J.W., Genchi C., Kramer L.H. et al. Heartworm disease in animals and humans. *Adv. Parasitol.*, 2008, vol. 66, pp. 193-285.
20. Morchón R., Carretón E., González-Miguel J., Mellado-Hernández I. Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe - New Distribution Trends. *Front. Physiol.*, 2012, vol. 3, Art. 196.
21. Renaud F. Biodiversite, genetiqueet evolution dans les systemes hotes-parasites. *Bull. Soc. Zool. Ff.*, 1992, vol. 117, no.1, pp. 109-115.

22. Rivasi F., Boldorini R., Criante P. et al. Detection of *Dirofilaria (Nochtiella) repens* DNA by polymerase chain reaction in embedded paraffin tissues from two human pulmonary locations. *APMIS*, 2006, vol. 114, no. 7-8, pp. 567-574.
23. Sun M., Zhuo W., Guo S. et al. Serological survey of canine dirofilariosis in Chongqing, Kunming, Nanchang, Fuzhou, Guangzhou, Shenzhen, and Nanning in Southern China. *Vet. Parasitol.*, 2012, vol. 185, no. 2-4, pp. 225-228.
24. Weil G.J., Malane M.S, Powers K.G. Detection of circulating parasite antigens in canine dirofilariosis by counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1984., vol. 33, no. 3, pp. 425-430.

Russian Journal of Parasitology, 2016, V.36, Iss.2

DOI:

Received: 24.02.2016.

Accepted: 01.05.2016

MATURE *SETARIA LABIATO-PAPILLOSA* IN CATTLE – A SOURCE FOR RECEIVING ANTIGENS FOR DIAGNOSIS OF DIROFILARIASIS (*DIROFILARIA IMMITIS*)

Berezhko V.K., Khaydarov V.K., Napisanova L.A., Thakahova A.A.

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin,
117218 Russia, 28 B. Cheremushkinskaya St., e-mail: berejko@vniigis.ru, napisanova@vniigis.ru.

Abstract

Objective of research: to estimate the efficacy of fractionated antigen of mature cattle parasites *Setaria labiato-papillosa* in diagnosis of dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*).

Materials and methods: Antigens of mature *Setaria labiato-papillosa*, reference sera from infected and not infected dogs. Reaction of immunodiffusion (RID) in agar gel using reference sera from dogs infected with *D. immitis*, and extracts from *S. labiato-papillosa* and *D. immitis*. Gel-chromatographic method on Pharmacia columns of Superose 12 Prep Grade and immunoenzymatic reaction (IER).

Results and discussion: The reaction of immunodiffusion (RID) was used to detect cross-reacting antigens of *D. immitis* and *S. labiato-papillosa*. The fractionation of antigen-extract from *S. labiato-papillosa* allows to get 40 protein fractions, 7 (17,5%) of which were of interest for diagnosis of dirofilariosis. The evaluation of these fractions with respect to diagnosis of dirofilariosis was performed by immunoenzymatic reaction with 47 serum samples from dogs including 11 serum samples from *D. immitis* infected dogs; 6 - *D. repens*; 3 – *Babesia canis*; 3 – *Toxocara canis*; 9- samples from dogs with non-parasitic pathology and 15 – from clinically healthy dogs. These results revealed that in one of 11 serum samples infected by *D. immitis*, and in two of 6 serum samples infected by *D. repens* - a false-negative response has been registered.

The test sensitivity was 82,4%, the specificity – 83,3%. The sensitivity of the similar test with these sera using the purified antigen extract from mature *D. immitis*, was also 82,4%, and the specificity – 86,7%.

The comparability of diagnostic test results for dirofilariasis by IER using antigenic preparations from *Setaria* and *Dirofilaria* allows to come to a conclusion that it is possible to use *S. labiato-papillosa* as a source of antigen for diagnosis of dirofilariasis (*D. immitis*).

Keywords: *Setaria labiato-papillosa*, *Dirofilaria immitis*, cattle, dog sera, fractionated antigen, immunoenzymatic reaction.

© 2016 The Author(s). Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI)http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org/Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>)