

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ДИРОФИЛЯРИОЗА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОМАТИЧЕСКОГО АНТИГЕНА *DIROFILARIA REPENS*

Бескровная Ю.Г., Нагорный С.А., Васерин Ю.И.
ФГУН РостовНИИМП Роспотребнадзора

Введение. Диагностика дирофиляриоза человека, в нашей стране основывается на комплексном анализе, эпизоотологических и эпидемиологических данных, изучении морфологии удаленного гельминта с определением вида, пола, размеров тела, изучения степени зрелости половой системы (Супряга В.Г. с соавт., 2004). Однако, данные об атипичном нахождении дирофилярий у человека в легких и внутренних органах, делают затруднительным постановку диагноза. Обнаружение легочных или подкожных «опухолей» у человека всегда приводит к подозрению на злокачественную природу этих образований (больные обращаются за медицинской помощью к онкологам, окулистам, хирургам, в связи с появлением подкожных образований на различных частях тела, сопровождающихся зудом, болезненностью, отеками) поэтому, возрастает необходимость в разработке эффективных методов клинической лабораторной диагностики болезни (Simon F., Genchi C., 2001).

Целью настоящего исследования является оценка эффективности соматического очищенного антигена *Dirofilaria repens* для его использования в диагностике дирофиляриоза у людей с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Материалы и методы. Нами была разработана технология получения очищенного соматического антигена из неполовозрелой самки *Dirofilaria repens* на способ приготовления которого получено положительное решение на патент РФ от 25.11.2008 г. Для получения специфического антигена неполовозрелую самку *D. repens*, удаленную хирургическим путем, отмывали многократно физиологическим раствором. Проводили последовательно механическую и ультразвуковую гомогенизацию из замороженного состояния с экстракцией белков в 0,25 М водном растворе сахарозы. Супернатант растворяли в охлажденном ацетоне, центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. Осадок высушивали под вакуумом, растворяли в калий-фосфатном буфере pH 6,4 и центрифугировали. Надосадочную жидкость использовали в ИФА для выявления антител к *Dirofilaria repens* у людей, инвазированных данным паразитом. Полученный антиген использовали в концентрации 40 мкг/мл в объеме 100 мкл на лунку. Разведение сывороток 1:200. В ИФА использованы антивидовые конъюгаты против иммуноглобулинов класса G человека.

Результаты ИФА учитывали на колориметрическом анализаторе «Opsys MR» фирмы Dynex при длине волны 450nm.

С помощью ИФА были обработаны сыворотки крови 102 человек, из них 41 больной дирофиляриозом, с подтвержденным диагнозом, 20 больных другими паразитозами, 41 «условно здоровых».

Результаты. Результаты иммунологического исследования показали, что в группе больных дирофиляриозом выявлено $80,5 \pm 6,3\%$ серопозитивных, больных другими паразитозами $15,0 \pm 8,2\%$, «условно здоровых» - $9,8 \pm 4,7\%$ (табл.). Средняя геометрическая титра антител (СГТА) у перечисленных контингентов составляла соответственно 9,7; 8,2; 8,1 $\log_2$. В группе больных дирофиляриозом у серопозитивных лиц средняя геометрическая титра антител составила 10,0 $\log_2$, в то время как у серонегативных из той же группы - 8,4 $\log_2$. Отрицательный результат в группе с дирофиляриозом чаще был отмечен у больных, в клинической картине которых отсутствовала миграция гельминта или с момента появления первых признаков заболевания прошло 1-3 дня, что, по-видимому, можно объяснить низким иммуногенным раздражением или ранним сроком болезни и недостаточным уровнем Ig G в крови. В группе больных паразитарными заболеваниями позитивный ответ получен у лиц с диагнозами: лямблиоз ($11,1 \pm 10,5\%$), токсокароз ($18,2 \pm 11,6\%$).

Таблица

**Результаты ИФА с соматическим очищенным антигеном
Dirofilaria repens с сыворотками крови людей**

№ пп	Контингент обследованных	Кол-во обсле дован- ных	Результаты ИФА		
			положите льный(%)	отрицатель ный (%)	СГТА($\log_2$)
1	Больные дирофиляриозом	41	$80,5 \pm 6,3$	$19,6 \pm 6,3$	9,7
2	Больные другими паразитами: - лямблиозом; - токсокарозом;	20	$15,0 \pm 8,2$	$85,0 \pm 8,2$	8,2
		9	$11,1 \pm 10,5$	$88,9 \pm 10,5$	8,0
		11	$18,2 \pm 11,6$	$81,8 \pm 11,6$	8,2
3	Условно здоровые лица	41	$9,8 \pm 4,7$	$90,2 \pm 4,7$	8,5

Полученные данные показывают, что чувствительность ИФА с соматическим очищенным антигеном достигает $80,5 \pm 5,9\%$, а специфичность – $88,5 \pm 5,9\%$.

Дополнительные исследование специфичности очищенного соматического антигена *Dirofilaria repens* проводили в ИФА с помощью реакции ингибирования антител. Для этого соматический антиген в

различных разведениях (концентрация белка от 21,90 до 1,10 мкг/мл) добавляли в стандартизированные дозы сыворотки больного дирофиляриозом, титр антител которой составлял 1:800 ($9,6 \log_2$). Инкубировали 30 мин. при 37 °С. Далее смесь антиген-антитело обрабатывали в ИФА по стандартной методике (рис. 1).

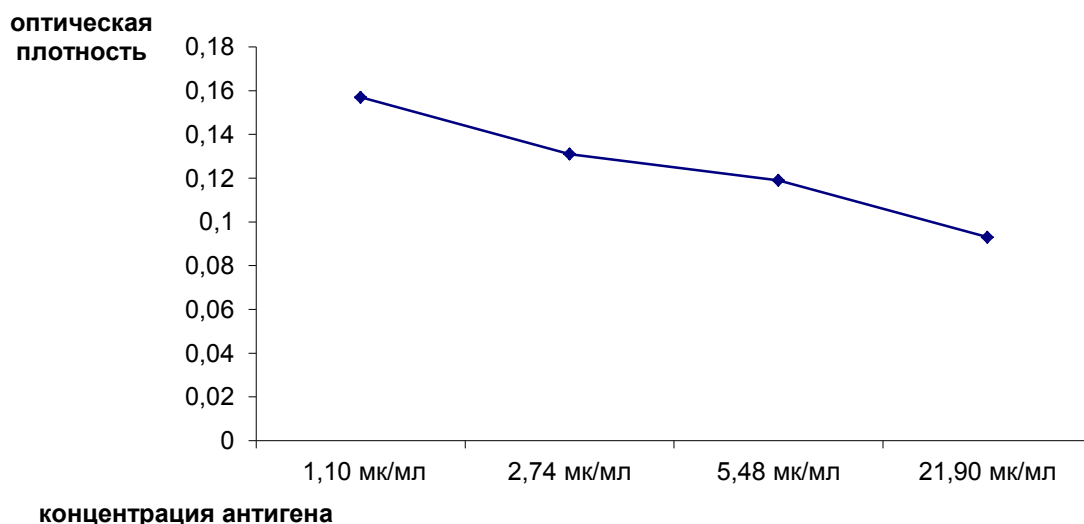


Рис. 1. Зависимость снижения оптической плотности антител от дозы вводимого антигена.

Как видно из рисунка, отмечалась ярко выраженная зависимость эффекта ингибирования от внесенной дозы антигена. Чем выше концентрация белка вносимого антигена, тем ниже оптическая плотность данной сыворотки.

Закключение. Достаточно высокие показатели чувствительности и специфичности ИФА с соматическим очищенным антигеном *D. repens* дают основание считать предлагаемый метод эффективным для диагностики дирофиляриоза человека. А получение положительных результатов среди здоровых лиц позволяет использовать его в качестве инструмента для сероэпидемиологического обследования населения с целью изучения иммунологической структуры и частоты контакта с возбудителем.

Литература: 1. Супряга В.Г., Цыбина Т.Н., Денисова Т.Н., Морозов Е.Н. и др. // Мед. паразитол. - 2004. - №4. - С. 6 - 8. 2. Simon F., Claudio G. Heartworm infection in humans and animals / Ediciones Universidad de Salamanca. – 2001. – 210 p.

Efficacy evaluation of diagnosis of *Dirofilaria repens* infection in humans using the *D. repens* somatic antigen. Beskrovnaya Yu.G., Nagorny S.A., Vaserin Yu.I. Rostov Scientific Research Institute of Medical Parasitology.

Summary. One suggested ELISA using the purified *D. repens* somatic antigen for diagnosis of *D. repens* infection in humans. The sensitivity and specificity values appeared to be $80,5 \pm 5,9$ and $88,5 \pm 5,9\%$ respectively.