

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ДИРОФИЛЯРИОЗА У СОБАК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОМАТИЧЕСКОГО АНТИГЕНА *DIROFILARIA REPENS*

Бескровная Ю.Г., Назорный С.А., Васерин Ю.И.

ФГУН РостовНИИМП Роспотребнадзора

Введение. На юге России отмечена стойкая тенденция возрастания количества инвазированных животных и людей, что обусловлено, прежде всего, высокой пораженностью данным возбудителем собак и отсутствием надлежащих мер по их выявлению и дегельминтизации. В настоящее время установить достоверный диагноз и произвести видовую идентификацию дирофилярий в организме различных хозяев достаточно сложно. У собак (окончательных хозяев) диагностика дирофиляриоза, затруднена из-за того, что данное заболевание может продолжительное время протекать бессимптомно, особенно при низкой микрофиляриемии и отсутствии, или незначительном количестве половозрелых паразитов (Tarello W., 1999). Скрытые инвазии могут быть связаны с препатентной стадией паразита, с "однополыми" гельминтами, с применением противомикрофилярицидной терапии и другими причинами.

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

Материалы и методы. В работе использовали специфический антиген полученный из неполовозрелой самки *D. repens*, удаленной хирургическим путем. Проводили последовательно механическую и ультразвуковую гомогенизацию гельминта 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. На способ приготовления данного антигена получено положительное решение на патент РФ от 25.11.2008 г.

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 собаки.

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

С помощью ИФА были обработаны сыворотки крови 170 домашних собак. Из них у 114 животных в крови были обнаружены микрофилярии, у 56 микрофилярии в крови отсутствовали. В группе собак с микрофиляриемией находились 23 особи с микрофиляриями, идентифицированными по

морфологическим признакам как *D. repens*, 23 – *D. immitis* и 68 животных, в крови которых обнаружено наличие личинок двух видов паразита. В группу собак свободных от микрофилярий вошли 22 животных, различного пола породы и возраста без признаков болезни, 27 здоровых животных (щенки в возрасте до 5 месяцев) и 7 больных токсокарозом.

Параллельно сыворотки собак были обработаны в коммерческой диагностической тест-системе ELISA (Canine Heartworm Antigen Test Kit) (IDEXX laboratories, США), которая выявляет циркулирующие растворимые антигены *Dirofilaria immitis*.

Результаты. Результаты иммунологического исследования показали, что в группе больных дирофиляриозом собак с микрофиляриемией выявлено $79,8 \pm 3,8\%$ серопозитивных, в группе животных без микрофиляриемии $28,6 \pm 6,1\%$. У щенков и больных другими паразитозами животных положительных результатов не выявлено (табл. 1). Средняя геометрическая титра антител составила: для животных, больных дирофиляриозом (с микрофиляриемией) - $9,5 \log_2$ из них у собак с микрофиляриями *D. repens*, *D. immitis* и животных, с личинками обоих видов паразита соответственно: 10,2; 8,3; $10,0 \log_2$. У животных, без признаков болезни (без микрофиляриемии) – $9,6 \log_2$; у щенков – $8,0 \log_2$ и у животных больных другими паразитозами – $8,2 \log_2$ ($P < 0,05$).

Таблица

Диагностическая эффективность ИФА с соматическим очищенным антигеном *Dirofilaria repens*

№ п.п.	Группы обследованных	Кол-во обследованных	Результаты ИФА		
			положительный (%)	отрицательный (%)	СГТА (\log_2)
1.	Собаки больные дирофиляриозом (с микрофиляриемией):	114	$79,8 \pm 3,8$	$20,2 \pm 3,8$	9,5
	- <i>D. repens</i>	23	100,0	-	10,2
	- <i>D. immitis</i>	23	-	100	8,3
	- <i>D. repens</i> и <i>D. immitis</i>	68	100,0	-	10,0
2.	Собаки свободные от микрофилярий:	56	$28,6 \pm 6,1$	$71,4 \pm 6,1$	8,8
	- животные без клинических признаков дирофиляриоза.	22	$72,7 \pm 9,7$	$27,3 \pm 9,7$	9,6
	- щенки в возрасте до 5 мес.	27	-	100,0	8,0
	- больные токсокарозом.	7	-	100,0	8,2

Высокие титры антител к *D. repens* среди животных без микрофиляриемии ($9,6 \log_2$), позволяют предположить, что они могли перенести заболевание, по-видимому, в стертой форме. В тоже время, соотношение результатов диагностического теста и отсутствие клинических признаков заболевания в данной группе животных свидетельствуют о наличии ложноположительных результатов. Таким образом, наличие собак без признаков болезни, в крови которых присутствуют антитела к *D. repens*,

позволяют определить специфичность данной тест системы, которая составила $71,4 \pm 6,1\%$.

Для определения антигенемии и паразитемии, исключающие наличие у животных скрытой инвазии *D. immitis*, и, возможно, перекрестные реакции между двумя видами паразитов, соответствующие сыворотки были обработаны в коммерческой диагностической тест-системе ELISA (Canine Heartworm Antigen Test Kit), которая выявляет антиген *D. immitis*. В группе больных дирофиляриозом собак (с микрофиляриемией) выявлено $64,0 \pm 4,3\%$ серопозитивных, в группе животных без признаков болезни - $77,3 \pm 9,1\%$. Сыворотки крови собак контрольной группы положительных результатов не дали.

У $19,3 \pm 3,6\%$ сывороток крови собак в ELISA обнаружены только антигены *D. immitis*, а в $18,7 \pm 3,5\%$ – в ИФА только антитела к антигену *D. repens*. Это исключает присутствие у последних скрытой инвазии дирофиляриями *D. immitis* и доказывает высокую специфичность ИФА с антигеном *D. repens*, а также отсутствие внутривидовых перекрестных реакций. Результаты проведенных исследований показали, что чувствительность ИФА с соматическим очищенным от липидов антигеном *D. repens* с сыворотками крови больных собак составила 100%.

Заключение. Высокие показатели чувствительности и специфичности ИФА с соматическим очищенным антигеном *D. repens* позволяют нам считать его эффективным методом диагностики дирофиляриоза у животных, особенно при низком уровне микрофиляриемии или стертой форме инвазии. Это открывает новые перспективы своевременно проводить лечение дирофиляриоза у животных, а также осуществлять дифференциальную диагностику и предотвратить дальнейший риск распространения инвазии на эндемичных по дирофиляриозу территориях.

Литература: 1. Tarello W. La dirofilariose sous-cutanee a *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens* chez le chien. Revue bibliographique et cas clinique. Revue de Medicine Veterinaire. 150. -1999- P. 691-702. 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 dogs using the *D. repens* somatic antigen. Beskrovnaya Yu.G., Nagorny S.A., Vaserin Yu.I. Rostov Scientific Research Institute of Medical Parasitology.

Summary. Based on the performed investigations one concluded that ELISA using the *D. repens* purified antigen was the effective method of diagnosis of *D. repens* infection in dogs at low level of microfilaremia and atypical form of infection. That opened the new perspectives of treatment of *D. repens* infection in dogs as well as provided the different diagnosis and prevention of further risk of infection prevalence in the areas with high incidence of that infection.