

На правах рукописи

Богданова Татьяна Викторовна

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАРАЗИТИРОВАНИЯ *DIROFILARIA*
IMMITIS У СОБАК В АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ**

03.02.11 – паразитология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Астраханский государственный университет»

Научные руководители:

доктор медицинских наук
Бойко Оксана Витальевна

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук, профессор
Архипов Иван Алексеевич

кандидат биологических наук, с.н.с.
Кузнецов Дмитрий Николаевич

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина».

Защита состоится «___» _____ 2010 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.213.03 при Учреждении РАН Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН (119071 г. Москва, Ленинский проспект, д. 33).

С диссертацией можно ознакомиться: в библиотеке Учреждения РАН Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН по адресу: 119071 г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, факс (495) 952-31-46, e-mail: centrparasitol@mail.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2010 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.А. Малютина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Дирофиляриоз – трансмиссивное, зоонозное инвазионное заболевание, вызываемое гельминтами, относящимися к классу круглых червей Nematoda, отряду Spirurida, сем. Filariidae, роду *Dirofilaria*. Род *Dirofilaria* насчитывает более 20 видов. Возбудителями дирофиляриоза людей и животных являются представители 8 видов: *D. immitis*, *D. repens*, *D. tenuis*, *D. ursi*, *D. subdermata*, *D. lutrae*, *D. striata*, *D. spectans*. Распространенные на территории России возбудители инвазии *D. repens* (Railliet et Henry, 1911) и *D. immitis* (Leidy, 1856) являются облигатными паразитами плотоядных семейства псовых и кошачьих, *D. ursi* - бурого медведя и амурского тигра (М.Ш. Акбаев, 2001; И.А.Архипов, Д.Р.Архипова, 2004).

Проблема дирофиляриоза обусловлена широкой циркуляцией возбудителя в природной среде и отсутствием надлежащих мер по выявлению и дегельминтизации зараженных животных - облигатных дефинитивных хозяев (домашних собак и кошек). Одним из факторов распространения данного заболевания следует считать длительный латентный период (до 5 лет), в течение которого в крови присутствуют циркулирующие микрофилярии. Этот процесс сочетается с повсеместным расселением комаров, являющихся промежуточными хозяевами, их способностью к быстрому увеличению популяции и коротким периодом развития в них микрофилярий до личинок третьей стадии (И.А.Архипов, Е.Н. Борзунов, В.И.Шайкин, 2001; W.Tarello, 2000).

Патогенетическое действие оказывают взрослые гельминты *D. immitis*. У большинства собак с паразитированием в их организме небольшого количества особей явных признаков заболевания не проявляется (что резко повышает их эпизоотологическую опасность) и только при значительной инвазии отмечается нарушение функционирования кровеносной системы. В основном это хроническая застойная, правосторонняя сердечная недостаточность. Кроме того, воз-

можны эндокардит сердечных клапанов и пролиферативный легочный эндоартериит. К летальному исходу приводят также легочная эмболия, вызываемая мертвыми или погибающими гельминтами, и синдром поллой вены, вызываемый теми же причинами. Контрольные мероприятия при этом заболевании трудноосуществимы, поэтому профилактика основывается преимущественно на лечении. В настоящее время эта проблема в Северной Америке настолько актуальна, что созданы специальные клиники для лечения сердечных гельминтозов (Д.Р. Архипова, 2003; А.Е.Р.Тейлор, 1960; М.А.Фисько, 2005).

Хотя дирофиляриоз регистрируется чаще в странах и регионах с теплым климатом, где имеет место большое количество комаров, являющихся промежуточными хозяевами, в последние годы отмечена тенденция к его широкому распространению не только на юге, но и в средней полосе России (Д.Р. Архипова, 2003; В.Г. Супряга и др., 2004; М.В. Сухова, 2002; В.Б. Ястреб, 2006). Рост заболеваемости дирофиляриозом, возможно, связан с изменением экологии и климата. Определенную роль могут играть и переезды домашних собак и кошек, которые путешествуют со своими хозяевами. По мнению Д.Р.Архиповой, (2002) основными причинами распространения дирофиляриоза являются неограниченные перемещения животных из одного региона в другой, плохо обустроенные оросительные каналы, создающие условия для массового выплода комаров – промежуточных хозяев, ввоз заболевания из других стран, ограничение использования химических средств защиты от гнуса, а также недостаточный арсенал антигельминтиков против взрослых дирофилярий.

Высокий уровень пораженности собак и обилие переносчиков создают явную угрозу и потенциальные возможности для роста инвазирования дирофиляриями во многих регионах мира, в том числе и России, в связи с чем, эту инвазию у человека и животных в соответствии с современной терминологией можно рассматривать как «emerging infection» или «возникающую инфекцию» (Г.Г.Онищенко, 2003).

Дирофиляриоз представляет большую опасность и для человека. В Российской Федерации и странах СНГ известно свыше 150 случаев поражения человека *D.repens*, истинная же заболеваемость людей дирофиляриозом в настоящее время неизвестна, так как не ведется её официальная регистрация. Вследствие недостаточной информированности врачей дирофиляриоз проходит под различными диагнозами непаразитарной этиологии (Т.И.Авдюхина, В.Ф.Постнова, Л.М.Абросимова, 1996, 1997).

В последние годы дирофиляриозу уделяется значительное внимание со стороны биологов, а также ветеринарных и медицинских специалистов (W.Tarello, 2000; М.В. Сухова, 2002; Д.Р.Архипова, 2003; М.А.Фисько, 2005; Р.С.Аракельян, 2007; В.Б.Ястреб, 2009 и др). Сообщаются сведения, касающиеся в основном, распространения дирофиляриоза в том или ином регионе или ассоциативном течении с другими болезнями. До сих пор в литературе недостаточно освещены количественные параметры развития *D.immitis* в организме дефинитивного и промежуточного хозяев, биологические особенности *D.immitis* и влияние нематоды *D.immitis* на организм собак различных пород в определенных условиях, а также методы диагностики, для выявления конкретного вида паразита и на любой стадии болезни.

Из вышеизложенного следует, что необходима тщательная регистрация и анализ всех выявленных случаев дирофиляриоза (*D.immitis*) с целью последующего статистического анализа, выявления устойчивых тенденций в заболеваемости с определением районов наибольшего риска заражения, усовершенствования методов диагностики, лечения и профилактики.

Цель исследования: изучение распространения дирофиляриоза, вызываемого *D. immitis* в условиях Астраханского региона; установление биологических особенностей паразитирования нематоды *Dirofilaria immitis* у собак и разработка нового метода диагностики паразитирования *Dirofilaria immitis* у плотоядных.

Для достижения цели в ходе исследования решались следующие задачи:

- установить восприимчивое поголовье дефинитивных хозяев *Dirofilaria immitis*, количественно изучить городскую популяцию собак и кошек в городе Астрахани;
- дать сравнительную оценку зараженности дирофиляриозом (*D. immitis*) собак в различных районах города, определить влияние возраста, пола, породы, типа содержания животных на зараженность *Dirofilaria immitis*.
- изучить промежуточных хозяев и их зараженность личинками дирофилярий, в различное время года;
- оценить степень летальности и биологические особенности паразитирования *Dirofilaria immitis*;
- разработать унифицированную методику выявления носительства *Dirofilaria immitis* у плотоядных.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые количественно определено поголовье собак и кошек, проживающих в условиях города Астрахани. Изучен биологический цикл развития нематоды *Dirofilaria immitis* у собак в условиях конкретного региона. Выяснено влияние пола, породы, условий содержания на зараженность собак дирофиляриями (*D. immitis*) и летальность. Разработан и внедрен новый метод диагностики дирофиляриоза (*D. immitis*).

Практическая значимость. Результаты исследований могут быть использованы для дальнейшего изучения данной нозоформы, разработки комплекса противоэпизоотических и эпидемиологических мероприятий при дирофиляриозе (*D. immitis*). Знание биологических особенностей паразитирования *D. immitis* у собак в конкретном регионе, поможет в постановке диагноза и прогнозировании планирования профилактических и лечебных мероприятий, направленных на снижение заболеваемости и смертности животных.

Метод диагностики паразитирования *Dirofilaria immitis*, отличается высокой чувствительностью и специфичностью и может быть использован для установления паразитирования на любой стадии болезни и любой интенсивности инвазии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Распространение дирофиляриоза, вызываемого *D. immitis* у собак в г.Астрахани.
2. Влияние сезона года, пола, возраста, породы и типа содержания собак на зараженность их *D. Immitis*.
3. Метод определения паразитирования *Dirofilaria immitis*, как способ диагностики при любой интенсивности инвазии и стадии болезни.

Апробация работы и внедрение в практику. Основные положения диссертационной работы доложены на научно-практических конференциях: «Проблемы ресурсодобывающего производства и переработки экологически чистой сельскохозяйственной продукции» (Астрахань, 2006 г.); «Актуальные проблемы современных аграрных технологий» (Астрахань, 2006 г.); «Актуальные проблемы современных аграрных технологий» (Астрахань, 2007 г.); научно-практическом симпозиуме «Лабораторная медицина: инновационные технологии в аналитике, диагностике, образовании, организации» (Москва, 2008 г.); объединенном иммунологическом форуме (С-Петербург, 2008 г.), V Международной научно-практической конференции «Aktualne problem nowoczesnych nauk -2009» (Przemysl, 2009), научно-практической конференции «Лабораторная медицина в свете Концепции развития здравоохранения России до 2020 года» (Москва, 2009).

Результаты проведенных исследований были апробированы и используются в лабораториях следующих кафедр: молекулярной биологии, генетики и биохимии ГОУ ВПО «Астраханский государственный университет»; общей и биоорганической химии ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицин-

ская академия». Предлагаемый метод диагностики был апробирован на группе собак, внедрен в практику в клиниках ветеринарной медицины города Астрахани и применяется в работе профильной лаборатории ГУ АО «Астраханская областная ветеринарная лаборатория».

По результатам исследований подана заявка на изобретение №2007131172 от 15.08.2007г. и получен патент на изобретение «Способ определения зараженности собак *Dirofilaria immitis*» № 2371145 от 27.10. 2009г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 научных статей, в том числе - 4 в изданиях из списка, рецензируемых ВАК Российской Федерации (журналы: «Вестник АГТУ» (2007), «Клиническая лабораторная диагностика» (2008), «Российский иммунологический журнал» (2008), «Ветеринарная Практика» (2008)).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, главы с описанием методов исследования, двух глав собственных результатов, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 123 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 29 таблицами и 12 рисунками. Указатель литературы включает 213 источников, в том числе 162 отечественных и 51 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследовательская работа проводилась с 2002 по 2009 годы самостоятельно и на базе кафедры молекулярной биологии, генетики и биохимии биологического факультета ГОУ ВПО «Астраханский государственный университет».

Изучение численности собак и кошек проводили методом опроса, поквартирного и подворного обхода, учета бездомных животных на улицах города Астрахани с последующей обработкой полученных данных на карте. Кроме того, учитывались официальные данные по регистрации животных в клубах

любителей домашних животных. Опрос проводился в двух районах города по три улицы в каждом районе, на каждой улице опрошено равное количество человек и обследовано равное количество квартир. Всего было обследовано 1000 квартир в благоустроенном секторе, опрошено 1200 человек в частном секторе.

Работу по исследованию крови на наличие микрофилярий проводили на базе ГУ АО «Астраханская областная ветеринарная лаборатория». Всего за 5 лет было проведено 800 исследований крови собак, из них кобелей – 521, сук – 279. Исследования проводили в день взятия крови. Пробы крови объемом 2-5 мл брали из подкожной вены предплечья или из вены Сафена в дневное время. В качестве антикоагулянта использовали 5,0% раствор цитрата натрия.

В работе использовали методы:

- 1) толстой раздавленной капли;
- 2) обогащения Кнотта;
- 3) тонкого фиксированного мазка с окраской по Романовскому-Гимзе.

Метод Кнотта, модифицированный Маркеллом и Воге (1965) – 2 мл периферической крови смешивали с 10 мл 1% раствора уксусной кислоты и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 2 минут. Далее после гемолиза верхний слой сливали, а из осадка готовили мазок на предметном стекле, фиксировали спиртовым раствором 95% и окрашивали по Романовскому-Гимзе по общепринятой методике. Размеры личинок изучали под световым микроскопом с помощью миллиметровой линейки. Анатомическое строение и идентификацию микрофилярий проводили после фиксации мазков спиртовым раствором 95% и окраской по Романовскому-Гимзе. Дифференциацию микрофилярий проводили по C.F.Schrey, E. Trautvetter (1996), S. Pampiglione (1995), W. Tarello (1999).

Породу, пол, возраст, хозяйственное назначение, тип содержания собаки определяли по паспорту и родословной или со слов владельца.

На территории городских улиц и квартир произведен отлов 229 комаров различных родов, из них *Culex* – 93, *Anopheles* – 67, *Aedes* – 69. Отлов проводи-

ли в вечернее время (с 19 до 21 часа) - как в городских квартирах, где есть домашние плотоядные, так и в собачьих питомниках, а также в условиях городских улиц. Насекомых оглушали этиловым эфиром, отрывали ножки и крылья. Затем тушки высушивали на предметных стеклах, фиксировали 96% спиртом и окрашивали по Романоскому-Гимзе, микроскопировали при увеличении $\times 90$. Идентифицировали до рода по Е.Н. Павловскому (1934). Вскрытие животных проводили в ГУ АО «Астраханская областная ветеринарная лаборатория». Всего проведено 135 неполных гельминтологических вскрытий по К.И.Скрябину (1928): П-образно сначала препарировалась кожа в районе грудной и брюшной полости, далее вдоль позвоночника выполняли разрез, открывая грудную и брюшную полость. Исследованию подвергали отдельные органы и ткани – подкожную клетчатку, сердце, печень, легкие, органы извлекали из трупа и исследовали.

За 5 лет в районах области было проведено 404 патологоанатомических вскрытий собак, для работы использовали годовые формы отчетов районных лабораторий области.

В качестве источника материала для получения антигена использовались свежие трупы животных, поступившие из Советского, Кировского и Ленинского районов города в ГУ АО «Астраханскую областную ветеринарную лабораторию». Было отобрано 10 собак различных пород – 3 кавказские овчарки, 2 среднеазиатские овчарки, 2 восточноевропейские овчарки, 3 крупные беспородные собаки, из них 3 суки и 7 кобелей. Возраст животных варьировал от 3 до 12 лет.

При конструировании метода диагностики «Способ определения зараженности собак *Dirofilaria immitis*» использовали:

- для приготовления антигена - половозрелые *Dirofilaria immitis* в количестве – 697; определение общего белка в полученном экстракте проводили рефрактометрическим методом на рефрактометре RL-3 по справочнику «Методы

клинической лабораторной диагностики» под ред. проф. И.П. Кондрахина (2004);

- для установления микробиологической чистоты антигена проводили его посев на следующие среды:

Агар Чапмана

Агар Мак Конки

Агар Сабуро

Агар Шэндлера + вит. К + кровь лошади.

также для посева использовали панель Микоплазма ДУО. Все используемые в работе среды производства Bio-Rad США;

- для получения антисывороток в виварии ГУ АО «Астраханская областная ветеринарная лаборатория», иммунизировали 10 серых кроликов весом 2,5-3 кг, для контроля использовали 3 серых кроликов той же возрастной группы, кровь у иммунизированных животных брали из краевой вены уха;

- для гипериммунизации использовали этих же кроликов;

- идентификацию антигенов проводили методом иммунодиффузии по Ухтерлони, используя микромодификацию этого метода, на трех предметных стеклах, используя штамп «семерка» (металлический пробойник для агара, состоящий из семи лунок), во влажной камере при температуре +4°C;

- иммуноэлектрофорез проводили с использованием набора «КлиниТест-ЭФ» производства НПЦ «Эко-Сервис», на оборудовании: электрофоретической ячейке Wade MiniCell GT System, блок питания PowerPac Basic (300) Power-Supple (Bio-Rad, США). Для отмывания балластных белков использовали 5% раствор хлорида натрия, окраску на белки проводили Амидо черным 10Б из набора «КлиниТест-ЭФ Амидо» производства НПЦ «Эко-Сервис» (Санкт-Петербург), для отбеливания фона использовали 5% раствор уксусной кислоты;

- для апробации метода использовали спонтанно зараженных дирофиляриозом (*D. immitis*) 75 собак. 25 животных, подлежащих выбраковке из собачь-

го питомника ФБУ ИК-8, остальные (50 собак) – у частных владельцев. В 10 случаях лечение животных не проводилось (контрольная группа). Для последующего патологоанатомического подтверждения поставленного нами диагноза наблюдения за животными проводилось в течение 2006 – 2008 гг.

Цифровой материал диссертации обработан математическими и статистическими методами (Плохинский, 1970), в компьютерной программе Microsoft Excel с вычислением средней арифметической (M), средней ошибки средней арифметической (m), вероятности различий (p) (Большев Л.Н., 1983, Мюллер П., 1982, Халафян А.А., 1995)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для распространения и развития дирофиляриоза (*D.immitis*) необходимы три обязательных компонента: источник инвазии, фактор передачи и восприимчивый организм. Астраханская область по своим природно-климатическим условиям и современному состоянию социума полностью соответствует критериям, способствующим распространению дирофиляриоза (*D.immitis*). Поэтому изучение распространения дирофиляриоза (*D.immitis*) плотоядных имеет приоритетное значение для города Астрахани и области. Жизненный цикл *D.immitis* продолжается 7-8 месяцев, плотоядные животные заражаются в период лета при нападении комаров рода *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* и др. Для Астраханской области этот период довольно значителен с марта-апреля по октябрь (первые насекомые появляются уже во второй декаде марта).

Изменение температурного режима в последнее десятилетие в Астраханской области имеет существенное значение в распространении дирофиляриоза – из-за высоких летних температур высыхают и заболачиваются лиманы и другие мелководные водоемы, что, в свою очередь приводит к новым местам выплода комаров и, следовательно, увеличению их численности. Удлинение сро-

ков весенне-осенних сезонов приводит к значительной продолжительности жизнедеятельности кровососущих и, соответственно, увеличению периода заражения дирофиляриозом (*D.immitis*).

Значительную эпидемическую опасность для жителей городской зоны представляют собаки и кошки, так как они являются соактантами ряда гельминтозов, опасных для человека. Эта опасность многократно возрастает из-за большого числа неучтенных бродячих собак и кошек. В настоящее время в городе Астрахани существуют устойчивые популяции домашних плотоядных: кошек (*Felis catus domesticus*) и собак (*Canis Familiaris domesticus*), которые являются восприимчивыми животными для заболевания и распространения дирофиляриоза (*D.immitis*).

В городе Астрахани в клубах любителей собаководства зарегистрировано около 2200 животных, в кинологических питомниках и приютах содержится около 600 собак. Количество незарегистрированных животных в десятки раз больше. С целью учета незарегистрированных животных нами были обследованы различные сектора города. В результате выяснилось, что в благоустроенном секторе 1 собака приходится на 29 человек, 1 кошка на 13 человек, в частном секторе 1 собака на 3-4 человека, кошка на 2-3 человека, кроме того, в каждом дворе благоустроенного фонда постоянно проживает около 3-5 собак и 5-10 кошек. В результате проведенных исследований также выяснено, что более 70% домашних животных не зарегистрированы, а популяции бродячих собак и кошек с каждым годом увеличиваются, а также их миграция по территории города, области и в другие регионы.

Всего по городу были получены следующие результаты - общее поголовье собак и кошек по городу Астрахани составило 299 527 животных, из них собак – 119 431 голов (16%), кошек – 180 096 голов (24%), всего домашних животных – 260 527 голов, бродячих - 39 000 голов.

Характеризуя дефинитивных хозяев дирофиляриоза (*D. immitis*) - кошек и собак городской зоны, одной из главных критериев опасности инвазии следует считать способ их содержания.

В городе Астрахани собаки и кошки неравномерно рассредоточены по городу, и их количество зависит от типа застройки жилья; явное преобладание, как собак, так и кошек наблюдалось в частном секторе. В связи с тем, что такой вид застройки есть в любом районе, это не исключает распространение инвазии повсеместно.

Исходя из потенциальной возможности заражения животных дирофиляриозом (*D. immitis*), мы условно поделили городские популяции кошек и собак на несколько категорий, взяв за основу классификацию, предложенную И. М. Зубаревой (2001).

Поголовье городских кошек в данное время представлено следующими категориями:

А – домашние кошки, лишенные возможности контакта с внешней средой;

В – полувольные кошки, живущие иногда в квартирах или в частных домах, имеющие возможность находиться на улице;

С – бродячие или бездомные кошки, живущие в подвалах, чердаках и других местах.

В настоящее время в мире насчитывается более 400 пород собак, которые А.П.Умельцев, (2001), условно поделил на 4 группы, по хозяйственному назначению: служебные, охотничьи, комнатно-декоративные и бойцовские. По способу содержания поголовье городских собак мы также разделили на категории с учетом вышеперечисленных групп:

А – домашние собаки, место обитания – городские квартиры и дома, места прогулок – улицы города и дворы; в данной группе - в основном породистые животные – комнатно-декоративных и служебных пород, бойцовские, а также

охотничьи породы собак, хозяева которых имеют дачные участки или выезжают на природу;

В – цепные собаки, место обитания и прогулок – частный сектор, изолированные дворы; в данной группе в основном собаки крупных пород – служебные и бойцовские, а также беспородные крупные собаки;

С – бродячие или бездомные собаки, местом обитания которых является все свободное жизненное пространство города и пригорода; это, в основном, беспородные животные, хотя есть и породистые собаки, брошенные хозяевами; все различных размеров.

Исходя из полученных ранее учетных данных, поголовье собак и кошек г.Астрахани распределены на категории по районам города (на 1000 человек).

Таблица 1

Количество собак и кошек по категориям в районах города

Район	Собаки (голов)	Категория	% от общего кол-ва	Кошки (голов)	Категория	% от общего кол-ва
Кировский	18±1,3	А	5,1	40±1,5	А	7,6
	86±1,4	В	24,2	110±1,2	В	21,2
	21±1,7	С	6,1	63±1,7	С	12,2
Советский	20±1,0	А	5,6	17±1,4	А	3,2
	174±1,5	В	49	215±1,0	В	42
	35±1,3	С	10	71±1,08	С	13,8

Наиболее многочисленной категорией у собак является «В» - «цепные» собаки, как в Кировском - 24,2%, так и в Советском - 49% районах; у кошек – категория «В» - полувольные кошки - как в Кировском - 21,2%, так и в Советском – 42%. Эти категории животных значительное время пребывают на улице и подвержены укусам комаров. Так же заметно, что процент бродячих животных - категория «С», остается высоким, и превалирует в 2 раза над домашними животными. Эта категория животных наиболее мобильна и может способство-

вать распространению дирофиляриоза (*D.immitis*) не только на территории города, но и по всей области.

В период активного лета комаров - с апреля по октябрь мы проводили исследования крови собак, различных категорий из разных районов города на наличие микрофилярий (*D. immitis*).

Таблица 2

Исследование крови собак на наличие микрофилярий

Год	Исследовано крови (проб)	Обнаружены микрофилярии (проб)	ЭИ, %
2003	12	1	8,3
2004	59	8	13,5
2005	233	34	14,6
2006	215	14	6,5
2007	281	102	36,3
2003-2007	800	159	15,9±5,3

Морфологические признаки микрофилярий изучали после окраски мазков по Романовскому-Гимзе. Размеры микрофилярий составили от 0,158 до 0,223 мм, в среднем $0,193 \pm 0,01$ мм в длину, и от 0,004 до 0,006 в среднем $0,005 \pm 0,0002$ мм в ширину. Головной конец микрофилярий слегка вытянут, конической формы, затемнен, крупнее остальной части тела, хвостовой конец длинный, конической формы сильно ссужен на конце, экскреторная и анальная поры неокрашены.

Среднемноголетняя экстенсивность инвазии у наблюдаемых собак составила – $15,9 \pm 5,3\%$. Наибольшая экстенсивность инвазии (ЭИ) наблюдалась у беспородных собак из категории «С» - 49%, немногим меньше в категории «В» - $16,82 \pm 4,3\%$, и наименьшая экстенсивность инвазии у собак из категории «А» - $3,2 \pm 0,2\%$. У декоративных пород собак за период наблюдения инвазия не регистрировалась.

Для проведения сравнительного ретроспективного анализа мы исследовали кровь на наличие микрофилярий *D.immitis* служебных собак тех же пород,

только находящихся в одинаковых условиях содержания. С этой целью провели обследование собак в кинологических питомниках. Экстенсивность инвазии у этих животных составила - $36,6 \pm 13,2\%$, а у собак из других категорий она значительно ниже - в 2,3 раза.

Зараженность собак дирофиляриозом (*D. immitis*) по результатам прижизненной диагностики мазков крови на наличие микрофилярий (табл. 3) в Советском районе оказалась выше, чем в Кировском, в 1,7 раза.

Таблица 3

Зараженность собак дирофиляриозом (*D. immitis*) в районах города

Район	Всего исследований	Обнаружены микрофилярии	% положительных
Кировский	214	24	11,2
Советский	189	37	19,6

В результате проведенного анализа был выявлен возраст зараженных дирофиляриозом (*D.immitis*) собак и он составил - от 1,5 до 15 лет; у собак до полутора лет инвазия не регистрировалась. Установлено, что болезнь регистрировалась значительно чаще у собак в возрасте от 4 до 10 лет; зараженность собак в возрасте от 1,5 до 3 лет является минимальной и составляет 1%, от 14 до 15 лет – 5%, от 11 до 13 лет – 8%; четверть зараженных приходится на возраст от 4 до 6 лет – 25%, наибольшее количество инвазированных дирофиляриозом собак наблюдалось в возрастном отрезке от 7 до 10 лет; наивысший же процент инвазированных наблюдался в двух возрастных группах - от 7 до 8 лет (31%) и от 9 до 10 лет (30%).

Кровь для исследований была отобрана у собак различного пола; результаты показали, что чаще в 2,5 раза заражаются дирофиляриозом (*D. immitis*) кобели, чем суки.

Наибольшее количество зараженных собак наблюдалась в августе – сентябре (ЭИ – 23,5%), а также в первые месяцы активного лета комаров – апреле – мае (18%) (среднемесячная температура воздуха в регионе в эти месяцы достигает + 26°C), наименьшая экстенсивность инвазии наблюдается в самые жаркие летние месяцы региона – июне – июле (16,5%).

Дирофилярии (*D. immitis*) – биогельминты, их развитие и распространение происходит с участием промежуточного хозяина – комара. С целью изучения особенностей промежуточного хозяина в регионе мы провели отлов комаров в период наибольшей их активности в августе месяце (с учетом заражаемости собак). Отлов проводили в вечернее время (с 19 до 21 часа) - как в городских квартирах, где есть домашние плотоядные, так и в собачьих питомниках, а также в условиях городских улиц. Всего исследовано 229 комаров родов *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*; при этом обнаружены микрофилярии у 15 особей, максимально инвазированы комары рода *Culex* (ЭИ – 8,6%), минимально – рода *Anopheles* (ЭИ – 4,5%).

Всего за период наблюдений проведено 135 неполных гельминтологических вскрытий собак тех пород, которые наиболее подвержены заражению дирофиляриозом (*D. immitis*). Из них пали от закупорки легочной артерии и задней поллой вены половозрелыми нематодами *D. immitis* – 31 собака (27,6±4,2 %), т.е., почти каждая четвертая собака гибнет в результате паразитирования дирофилярий (*D. immitis*). Самый большой процент гибели от дирофиляриоза наблюдался среди восточноевропейских овчарок (40%), самый низкий (15,8%) - у среднеазиатских.

Анализируя особенности распространения дирофиляриоза (*D. immitis*) в Астраханской области, нельзя не обратить внимание на сезонность. Гибель животных от дирофиляриоза, в результате паразитирования *Dirofilaria immitis* наступает не в течение всего года, а в определенные месяцы. Установлено, что гибель собак от дирофиляриоза (*D. immitis*) наступает преимущественно в - де-

кабре, январе, феврале, марте и июле. Февраль – самый холодный месяц в Астраханской области, и именно в нем отмечался максимальный процент павших животных – 48,4; минимальный процент - в июле (6,4%) - самом жарком месяце, гибель животных может быть связана с усилением нагрузки на сердечно-сосудистую систему.

В таблице 4 отражен скрининг зараженности собак по результатам исследований крови на наличие микрофилярий *D. immitis*, и падежа собак от ди-рофиляриоза (*D. immitis*) в разрезе пород:

Таблица 4

Сравнительная оценка зараженности *D. immitis* и падежа собак по породам

Породы собак	Исследования мазков крови			Патологоанатомические вскрытия		
	Всего	Обнар микрофил.	%	Всего	Обнар. ди-рофил.	%
Немецкая	130	13	10	12	4	33,3
Кавказская	146	48	32,8	18	5	27,8
Восточно-европейская	130	9	7,9	5	2	40
Среднеазиатская	132	11	8,3	19	3	15,8
Беспородные	262	78	29,7	81	17	21

Проведенный сравнительный анализ зараженности собак и их падежа в различные годы показывает пропорциональность зараженности и падежа, их прямую зависимость от климатических условий и количества переносчиков в различные годы наблюдений. Наиболее неблагоприятными в эпизоотическом плане по ди-рофиляриозу (*D. immitis*) можно считать 2004, 2005, 2007 годы ($p < 0,05$). Именно в эти годы отмечался наибольший процент зараженности и гибели собак.

В районах области регистрировали гибель собак от паразитирования нематод *D. immitis*, путем патологоанатомических вскрытий и обнаружения половозрелых гельминтов в местах локализации. В четырех районах области, та-

ких как Енотаевский, Черноярский, Харабалинский, Лиманский гибель собак от дирофиляриоза (*D. immitis*) не зарегистрирована. Наибольший процент гибели собак зарегистрирован в Наримановском и Камызякском районах области (13,5% и 6,3% соответственно). Эти районы области наиболее приближены к городу, расположены вдоль берегов Волги, в данных районах расположены места отдыха людей (дачные массивы, турбазы, базы отдыха, детские лагеря и «дикие» стоянки туристов). В Камызякском районе расположен Астраханский заповедник, с достаточным количеством диких плотоядных - таких как волки, лисы, енотовидные собаки и другие, что создает угрозу возникновения синантропного очага по дирофиляриозу (*D. immitis*) и в дикой природе.

Число павших животных от дирофиляриоза (*D. immitis*) в городе Астрахани в 4,6 раза превышал показатель по области ($27,6 \pm 4,2$ % и $6,0 \pm 1,6$ % соответственно).

Обнаруженные путем неполных гельминтологических вскрытий нематоды по морфологическим, анатомическим признакам идентифицированы как *Dirofilaria immitis*. Самки *D. immitis* – крупные белые нитевидные нематоды длиной - 250 ± 30 мм, шириной $0,960 \pm 0,370$ мм, хвостовой и головной концы – конусовидные, скрученные яичники в заднем отделе тела, поверхность тела имеет продольные гребни. Самцы *D. immitis* – белые нитевидные нематоды, немного меньше самок, их длина 150 ± 25 мм, ширина – $1,120 \pm 0,20$ мм. Хвостовой конец конической формы, немного закруглен и сильно ссужен (иногда закручен).

Дальнейшей целью наших исследований стала разработка метода ранней диагностики паразитирования у собак *Dirofilaria immitis*. Для приготовления антигенного диагностикума, нами были использованы *D. immitis*, извлеченные путем неполного гельминтологического вскрытия собак различных пород, пола и возраста.

Извлеченных *D. immitis* сначала промывали водопроводной, затем дистиллированной водой, далее измельчали на небольшие фрагменты ножницами,

затем тщательно растирали с добавлением кварцевого песка в фарфоровой ступке при добавлении небольшого количества физиологического раствора в течение двух часов до получения однородной массы. Затем полученную суспензию подвергали замораживанию при температуре - 4°C. В течение последующих трех суток суспензию извлекали из морозильной камеры и после некоторого оттаивания смесь тщательно растирали, а затем повторно подвергали замораживанию. Эту процедуру повторяли 3 раза.

В полученную суспензию добавляли физиологический раствор из расчета 1:3, учитывая первоначально добавленное количество физиологического раствора при растирании гельминтов. После чего полученную смесь экстрагировали путем четырехчасового встряхивания на шуттель-аппарате при комнатной температуре. Далее биомассу центрифугировали при 3000 оборотах/минуту в течение 30 минут. Надосадочную жидкость (экстракт) сливали, а к осадку прибавляли 10 мл физиологического раствора и повторно центрифугировали в течение 30 минут в том же режиме. Полученные порции экстрактов соединяли. Полученный экстракт для концентрирования помещали в диализный мешок. Содержание белка в данном экстракте составило – 15,2 г/л ($15,2 \pm 0,2$ мг/мл) ($P < 0,01$).

Для установления микробиологической чистоты антигена перед введением его кроликам проводили посев на питательные среды. Общепринятым методом была установлена бактериологическая пригодность антигена, приготовленного из *Dirofilaria immitis* для последующей иммунизации кроликов с целью получения антисывороток, необходимых для подтверждения чистоты полученного нами диагностикума.

Полный цикл иммунизации кроликов длился 12 суток. На подкожные и внутримышечные инъекции израсходовано – 7,7 мл антиген-экстракта и, соответственно – 117,04 мг белка.

Спустя 30 дней после последней инъекции, продолжили иммунизацию кроликов путем внутримышечных инъекций в различные участки бедер.

На весь курс иммунизации было израсходовано 11,4 мл антиген-экстракта, что составило 173,28 мг белка. Все животные опытной и контрольной группы живы.

Идентификацию антигенов проводили методом иммунодиффузии по Ухтерлони. Тем же способом было подтверждено отсутствие возможной реакции с перекрестно реагирующими антигенами (сывороткой крови, тканями легких и сердечной мышцы инвазированных собак) при проведении исследования рекомендуемым нами методом. В связи с тем, что чувствительность иммунодиффузного метода не всегда может достаточно точно свидетельствовать об отсутствии реакции идентичности или же частичной идентичности между антигенами, следующим этапом, подтвердившим иммунологическую частоту и высокую специфичность нашего диагностикума, был иммуноэлектрофорез.

Таким образом, в результате проведенных испытаний, получено достоверное подтверждение высокой иммунологической частоты (отсутствие перекрестно реагирующих антител, проверенной в два этапа – иммунодиффузией по Ухтерлони, а затем, с использованием иммуноэлектрофореза) и эффективности предлагаемого нами метода. Только его достоверно подтвержденная иммунологическая чистота позволила нам рекомендовать его к широкому применению.

Для проведения дальнейшей апробации метода «Способ определения зараженности собак *D. immitis*» нами была выбрана группа животных, спонтанно зараженных дирофиляриозом (*D. immitis*), выявленных по клиническому осмотру, аускультации. При выборе контрольных групп животных учитывали породу и возраст. Возраст животных составил - от 7 до 13 лет. Всех собак разбили на группы по породам. Перед началом эксперимента у всех животных взяли венозную кровь и исследовали на наличие микрофилярий *D. immitis* по модифицированному методу Кнотта.

У всех животных параллельно вышеописанным исследованиям получали венозную кровь и приготавливали сыворотки путем отстаивания и удаления сгустков. Сыворотки хранили в холодильнике при температуре +2...+4°C.

Далее проводили постановку реакции преципитации в агаровом геле, согласно методике «Способ определения зараженности собак *D. immitis*». Ранее приготовленный антиген из *Dirofilaria immitis* и сыворотки крови наблюдаемых собак вносили в вырезанные пробойником лунки агара, по следующей схеме: в центральную лунку вносили антиген, по периферии помещали сыворотки собак опытной группы.

Проведенная апробация метода в опытной и контрольной группах собак доказала его высокую специфичность и достоверность. В опытной группе эффективность предлагаемого нами метода составила – 98%, в контрольной группе – 100%. Экспериментальным путем была доказана высокая чувствительность и специфичность (98% и 97% соответственно) предлагаемого нами метода.

ВЫВОДЫ

1. При исследовании собак и кошек г. Астрахани выявлено восприимчивое поголовье дефинитивных хозяев *Dirofilaria immitis*: наиболее подвержены опасности заражения цепные собаки служебных пород, из-за длительного пребывания их вне помещений и более частого контакта с комарами.
2. По результатам исследований морфологии микрофилярий выявлено паразитирование у собак в Астраханской области - *D.immitis*. Максимальная микрофиляремия (ЭИ – 23,5%) наблюдалась у собак в августе-сентябре.
3. Микрофилярии обнаружили у собак 4-х служебных пород и беспородных, чаще инвазию регистрировали у кавказских и немецких овчарок и беспородных. У декоративных пород инвазию не регистрировали. Значитель-

ное влияние на зараженность оказывал тип содержания животных и хозяйственное назначение (бездомные и цепные).

4. Установлено, что чаще подвержены инвазии кобели, чем суки. Заражению подвержены собаки всех возрастов, наибольшее количество инвазированных в возрастном отрезке – от 7 до 10 лет ($30 \pm 1,0\%$), возрастной минимум приходится на 1,5-3 года (1,0%).
5. Среди промежуточных хозяев – комаров, наиболее инвазированы личинками диروفиларий (*D. immitis*) комары рода *Culex* (8,6%), менее рода *Aedes* (5,8%) и *Anopheles* (4,5%).
6. Результаты гельминтологических вскрытий подтвердили паразитирование у собак *D. immitis*. Летальность собак от диروفилариоза (*D. immitis*) наибольшая среди немецких и восточноевропейских овчарок, 81% всех летальных случаев приходится на зиму (декабрь - 10%, январь – 22,6%, февраль – 48%), осенью гибель животных не зарегистрирована.
7. Разработан и апробирован унифицированный метод диагностики «Способ определения зараженности собак *Dirofilaria immitis*», основанный на реакции преципитации специфичного антигена и сыворотки крови собак в агаровом геле, который отличается высокой чувствительностью и специфичностью (98% и 97% соответственно) и имеет ряд преимуществ: позволяет проводить массовые исследования крови собак и выявлять инвазию на любой стадии болезни.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Исходя из результатов наших исследований по изучению дирофиляриоза (*D. immitis*) собак в условиях Астраханской области для своевременной диагностики и усовершенствования мер борьбы с данной инвазией рекомендуем проводить следующие мероприятия:

1. Не реже одного раза в год в августе проводить обследование всех животных на наличие микрофилярий *D. immitis*, а также обследовать всех ввозимых на территорию области собак.
2. При подозрении на дирофиляриоз (*D. immitis*), необходимо принимать во внимание – возраст животного, породу, пол, сезон года и особенно способ содержания.
3. Для установления достаточно точного диагноза рекомендуется использовать разработанный «Способ определения зараженности собак *Dirofilaria immitis*» - ввиду его специфичности к определенному виду *Dirofilaria*, достоверности и надежности, а также финансовой доступности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Богданова Т.В. Дирофиляриоз собак в Астраханской области / Бойко О.В. //Журнал «Вестник АГТУ». – №4(39). - Астрахань, 2007. – С.137-139.
2. Богданова Т.В. Иммунологическая диагностика дирофиляриоза собак / Бойко В.И. // Российский иммунологический журнал. – Т.2(11), №2-3. – Москва, 2008. – С.164.
3. Богданова Т.В. Диагностика паразитирования *D. immitis* у собак в Астраханской области //Журнал «Ветеринарная практика».- № 4 (43). – С-Петербург, 2008. –С.24-26.

4. Богданова Т.В. Диагностическое использование антигена, приготовленного из *D. immitis* / Бойко В.И.// Журнал «Клиническая лабораторная диагностика» . - №9. – Москва, 2008. –С.52-53.
5. Богданова Т.В. Ветеринарный контроль за паразитами собак и кошек в г. Астрахани / Полковниченко А.П. // Материалы II Всеросс. научной конференции студентов и молодых ученых с межд. участием: «Актуальные проблемы современных аграрных технологий». – Астрахань, 2007. - С.199-200.
6. Богданова Т.В. Дирофиляриоз плотоядных в условиях Астраханской области /Полковниченко А.П.// Материалы международной научно-практической конференции: «Проблемы ресурсодобывающего производства и переработки экологически чистой с/х. продукции». - Астрахань, 2006 – С.77-78.
7. Богданова Т.В. Лабораторная диагностика и лечение дирофиляриоза собак / Полковниченко А.П.// Материалы межд. научно-практической конференции: «Проблемы ресурсодобывающего производства и переработки экологически чистой с/х продукции». - Астрахань, 2006 – С.82-83.
8. Богданова Т.В. Некоторые актуальные проблемы ветеринарной паразитологии в Астраханской области / Бойко О.В.// Материалы Российской научной конференции студентов и молодых ученых с межд. участием: «Актуальные проблемы современных аграрных технологий». – Астрахань, 2006. -С.111-112.
9. Богданова Т.В. Климато-географические особенности Астраханской области как приоритетный фактор распространения дирофиляриоза / Бойко О.В.// Materiały V międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji “Aktualne problemy nowoczesnych nauk-2009”. - Volume 18. - Przemysł, Nauka I studia, 2009. – P.45-46.
10. Богданова Т.В. Эпизоотологический мониторинг дирофиляриоза в Астраханской области // Materiały V międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji “Aktualne problemy nowoczesnych nauk-2009”. - Volume 18. - Przemysł, Nauka I studia, 2009. – P. 47-48.

11. Богданова Т.В. Иммунологический метод диагностики инвазии, вызываемой *D. immitis*/Бойко О.В., Бойко В.И.//Труды научно-практической конференции «Лабораторная медицина в свете Концепции развития здравоохранения России до 2020 года». – Москва, 28-30 сентября 2009. – С.220-221.