

На правах рукописи

Криворотова Елена Юрьевна

**«БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДИРОФИЛЯРИОЗА
В РЯДЕ СУБЪЕКТОВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»**

03.02.11 – паразитология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в Федеральном Бюджетном Учреждении Науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Нагорный Сергей Андреевич

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится «___» _____ 2015 г. в _____ часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Д 006.011.01, созданного на базе ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрябина»

Адрес: 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «ВНИИП им. К.И. Скрябина» и на сайте <http://www.vniigis.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Учёный секретарь совета по защите диссертаций
на соискание учёной степени кандидата наук,
на соискание учёной степени доктора наук,
д.б.н., профессор

Бережко Вера Кузьминична

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Дирофилярии – единственные гельминты с трансмиссивным путем передачи, вызывающие заболевания человека в странах умеренного климата. На протяжении последних десятилетий в мире отмечается расширение ареалов дирофилярий в северном направлении и рост заболеваемости людей (Pampiglione S., 2000, Akaо N., 2011, Salamatin R.V. et al., 2013). В Российской Федерации, как и в других странах, зарегистрировано увеличение числа случаев инвазии человека данным паразитом (Авдюхина Т.И. и др. , 1997, Сергиев В.П. и др. 2012) и расширение нозоареала дирофиляриоза (Назаренко М.Ю.,2000, Росоловский А.П. и др, 2013). Наблюдается усиление эпизоотологической напряженности дирофиляриозной инвазии собак не только на юге России, но и в других регионах страны (Азаров Н.А. и др., 2012, Пашкина Ю.В. и др. 2006, Ястреб В.Б., 2008 и др.). Число исследований по ксеномониторингу дирофиляриоза в Российской Федерации ограничено, что затрудняет оценку рисков его передачи на низкоэндемичных территориях. Несмотря на усовершенствование диагностики ряда паразитозов, отсутствуют неинвазивные методы лабораторной диагностики дирофиляриоза человека.

Изучение биологических особенностей системы паразит-хозяин при дирофиляриозе, эпизоотологических и эпидемиологических аспектов данного заболевания позволит усовершенствовать диагностику, повысить эффективность лечения, прогнозировать эпидемиологическую ситуацию в разных ландшафтно-климатических зонах России с учетом температурных данных, наличия паразитоносителей и переносчиков возбудителей дирофиляриоза и оптимизировать меры профилактики данного гельминтоза.

Цель. Выявить эпизоотологические и эпидемиологические аспекты дирофиляриоза в ряде субъектов Российской Федерации и усовершенствовать диагностику данного заболевания.

Задачи:

1. Изучить эпизоотологическую ситуацию по дирофиляриозу в ряде субъектов Российской Федерации.
2. Провести анализ зарегистрированных случаев дирофиляриоза человека и картографирование инвазии среди людей.
3. Разработать способ получения соматического антигена из половозрелой самки *Dirofilaria immitis* и оценить диагностические качества антигена в иммуноферментном анализе при сердечном дирофиляриозе собак.

4. Исследовать диагностическую значимость иммуноферментного анализа для диагностики дирофиляриоза человека (*D. repens*).

5. Изучить потенциал метода масс-спектрометрии для дифференциации видов *D. repens* и *D. immitis*.

6. Определить значимость температурных моделей для прогнозирования распространения дирофиляриоза человека и животных.

Научная новизна: 1. Комплексно изучена паразитарная система при дирофиляриозе, соактантами которой являются *D. repens* и *D. immitis*, собака, кошка, кровососущие комары и человек, на разных климатогеографических территориях России. 2. Впервые определен уровень зараженности окончательных (собаки) и промежуточных хозяев дирофиляриями в Новгородской области. 3. Впервые изучена возможность дифференциации видов *D. repens* и *D. immitis* методом масс-спектрометрии MALDI-TOF MS. 4. Разработан способ получения очищенного соматического антигена *Dirofilaria immitis* с высокими показателями диагностической эффективности в ИФА в отношении сердечного дирофиляриоза собак. 5. Составлены карты распространения дирофиляриоза человека и собак на территории Российской Федерации. 6. Впервые рассчитаны температурные модели дирофиляриоза для городов Ростов-на-Дону, Анапа, Астрахань, Великий Новгород. Показана непригодность температурного моделирования дирофиляриоза с использованием данных климатического мониторинга о среднесуточной температуре воздуха окружающей среды для прогнозирования данной инвазии. Установлены оптимальные сроки профилактической дегельминтизации собак с помощью расчета сумм единиц развития дирофилярий по данным территориальных метеостанций для городов Ростов-на-Дону, Анапа, Астрахань, Великий Новгород.

Практическая значимость. Исследования эпизоотологической ситуации по дирофиляриозу позволят оптимизировать профилактические и противоэпидемические мероприятия в отношении этого паразитоза. Данные картографирования могут быть использованы при планировании профилактических мероприятий по снижению риска заражения дирофиляриозом человека и животных. Соматический антиген *D. immitis* может быть использован при разработке отечественного диагностикума для определения зараженности собак сердечным дирофиляриозом и внедрен в ветпрактику. Результаты масс-спектрометрического анализа *D. repens* и *D. immitis* могут быть использованы для создания эталонных масс-спектров дирофилярий, что позволит проводить видовую идентификацию дирофилярий методом MALDI-TOF MS. Расчет температурной модели дирофиляриоза (единиц развития дирофилярий - ЕРД) позволил определить сроки профилактики данного гельминтоза у собак на юге России (гг. Ростов-на-Дону, Анапа и Астрахань, в период с 15 мая до 3 ноября) и северо-западе европейской части России (г. В. Новгород, с 15 июня по 31

августа). Расчет температурных моделей (ЕРД), наряду с изучением зараженности собак и комаров дирофиляриями, позволит обосновать сроки химиопрофилактики дирофиляриоза у собак на эндемичных территориях.

Материалы выполненной работы использованы для подготовки следующих документов:

СанПиН 3.2.3215-14 «Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации» (зарегистрирован в Министерстве юстиции Российской Федерации 12.11.2014 № 34659);

Проект МУ «Профилактика дирофиляриоза» (предложения направлены в организацию-разработчик Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, исх. №301 от 10.06.2014 г.).

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. В населенных пунктах в качестве источника распространения дирофиляриоза наибольшее значение имеют собаки (безнадзорные, домашние, служебные), роль кошек в трансмиссии дирофиляриоза незначительна. Распространению дирофиляриоза на низкоэндемичных территориях (с подходящими для осуществления биологического цикла условиями) способствуют перемещения домашних и служебных собак при несоблюдении адекватных мер профилактики.

2. Соматический антиген *D. immitis* обладает высокой диагностической эффективностью в иммуноферментном анализе при сердечном дирофиляриозе собак: специфичность - $86,9 \pm 2,8$ %, чувствительность - $93,3 \pm 2,1$ %, точность - $90,7 \pm 2,4$ %, показатель AUC - 0,876. Иммуноферментный анализ с антигеном *D. repens* обладает высокой чувствительностью и специфичностью ($75,4 \pm 3,8$ и $88,9 \pm 2,8$ % соответственно) к Ig *D. repens* и может использоваться для лабораторной диагностики данного гельминтоза у человека. Метод масс-спектрометрии MALDI-TOF MS позволяет проводить дифференциацию видов *D. repens* и *D. immitis* по белковому спектру.

3. Температурные модели дирофиляриоза, рассчитываемые на основании показателей среднесуточной температуры воздуха, не подходят для долгосрочного прогнозирования распространенности данной инвазии. Расчет сумм единиц развития дирофилярий позволит определить сроки сезонов передачи дирофиляриоза и проведения профилактики данного гельминтоза у собак.

Апробация работы и внедрение в практику. Основные положения диссертации доложены на: научно-практической конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными

болезнями» (г. Москва, 2012, 2013, 2014 гг.), научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Новые научные достижения молодых ученых в эпидемиологии, клинике, диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней» (г. Москва, 2012 г.), V Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (г. Москва, 2013 г.), V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2013 г.), V Съезде Паразитологического общества при РАН: Всероссийской конференции с международным участием (г. Новосибирск, 2013 г.), научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» (г. Санкт-Петербург, 2014 г.). Стендовые доклады представлены на: Всероссийской конференции «Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период» (г. Тюмень, 2013 г.), VI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (г. Москва, 2014 г.).

Метод иммуноферментного анализа с применением очищенного соматического антигена *D. immitis* апробирован в ветеринарных клиниках «Визар» и «Балу» г. Ростов-на-Дону. Практика показала, что данный метод обеспечивает высокую специфичность и чувствительность теста к антителам *D. immitis* у собак.

Публикации. По результатам проведенных исследований опубликованы 22 печатные работы, 2 из них в рекомендованных ВАК изданиях.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 141 странице компьютерного текста, включает 11 таблиц, 30 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения и выводов. Список литературы включает 262 источника, в том числе 87 отечественных и 175 зарубежных авторов.

Личный вклад соискателя. Представленная работа является результатом 6-летних исследований. Автор лично провел большую часть наблюдений, исследований и экспериментов, собрал, систематизировал и проанализировал полученные результаты.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю Нагорному С. А за неоценимую методическую помощь при проведении исследований, анализе полученной информации, обобщении данных и внедрении результатов в клиническую практику. Выражаю признательность Ермаковой Л. А., Хроменковой Е. П. за ценные советы. Выражаю благодарность руководителям, паразитологам и энтомологам ФБУЗ «Центрам гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора и ТУ Роспотребнадзора в Ростовской, Астраханской и Новгородской областях, Краснодарском крае, Республиках Адыгея, Карачаево-Черкесия и Калмыкия за помощь в сборе биологического материала и за помощь в организации работы во время экспедиционных выездов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

Представлен анализ научных работ отечественных и зарубежных ученых, посвященных эпизоотологии и эпидемиологии дирофиляриоза, его лабораторной диагностике у человека и животных, температурному моделированию дирофиляриоза и оценке влияния климатических изменений на распространение данного гельминтоза.

2. Материалы, методы и объем исследований

Исследования проводились с 2009 по 2014 годы на базе ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора. Объектами исследования являлись: личинки и взрослые особи *Dirofilaria repens* и *Dirofilaria immitis*; соматические антигены *D. immitis* и *D. repens*, протеом *D. repens* и *D. immitis*, кровососущие комары, кровь собак, кошек и людей; анкетные данные больных дирофиляриозом, данные ФБУЗ «ЦГиЭ» Роспотребнадзора о зарегистрированных случаях дирофиляриоза человека, данные метеостанций (ежедневная среднесуточная температура воздуха окружающей среды) Ростов, Анапа, Астрахань, Новгород. Объем исследованного материала представлен в таблице 1.

Таблица 1. Объем проведенных исследований

Материал и методы исследования	Число исследований
Диагностическое микроскопическое исследование препаратов крови собак с применением метода: <ul style="list-style-type: none"> ▪ концентрации в 3% уксусной кислоте ▪ гистохимической окраски на кислую фосфатазу 	2364 48
Диагностическое микроскопическое исследование препаратов крови кошек	632
Ларвомикроскопия препаратов самок кровососущих комаров	6071
Анкеты лиц с диагнозом дирофиляриоз	75
Данные ФБУЗ «ЦГиЭ» Роспотребнадзора о зарегистрированных случаях дирофиляриоза человека	1093
Исследования имаго нематод, удаленных у человека и собаки:	

<ul style="list-style-type: none"> ▪ морфологические ▪ гистологические 	<p>80</p> <p>75</p>
Диагностическое микроскопическое исследование препаратов крови человека	59
Иммунологические исследования сывороток крови собак методом ИФА с целью выявления антител класса IgG к <i>D. immitis</i>	150
Иммунологические исследования сывороток крови людей методом ИФА для выявления антител IgG к <i>D. repens</i> :	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ с удаленной <i>D. repens</i> ▪ больных другими паразитозами и «условно – здоровых» лиц ▪ кинологов 	<p>57</p> <p>72</p> <p>27</p>
Масс - спектрометрические исследования взрослых гельминтов:	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>D. repens</i> ▪ <i>D. immitis</i> 	<p>10</p> <p>10</p>
Данные о среднесуточной температуре воздуха метеорологических станций (количество суток):	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ростов ▪ Анапа ▪ Астрахань ▪ Новгород 	<p>6205</p> <p>1460</p> <p>1460</p> <p>1825</p>

Подготовку комаров к лабораторному исследованию на зараженность микрофиляриями проводили согласно МУ 3.1. 3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней». Подготовленные препараты обрабатывали несколькими каплями 3% раствора уксусной кислоты, фиксировали этиловым спиртом, окрашивали краской Романовского-Гимза и микрофотографировали.

Исследование крови на наличие личинок дирофилярий у собак, кошек и человека проводили методом ларвоскопии после концентрации в уксусной кислоте. Кровь в объеме 500-1000 мкл растворяли в 10 мл 3 % уксусной кислоты, выдерживали 5-7 минут при +18 +25° С. Пробу центрифугировали 7 минут при 2000 об/мин, из осадка готовили мазок, испаряли жидкость при +18 +25° С, фиксировали 96%-ным этиловым спиртом, окрашивали по методу Романовского-Гимза, микрофотографировали. Видовую идентификацию микрофилярий проводили под иммерсией по анатомическому строению и длине тела (ESCCAP Guideline 5, 2012).

Для видовой идентификации микрофилярий также использован метод окрашивания на кислую фосфатазу, видовую принадлежность дирофилярий определяли в зависимости от локализации скоплений фермента (Chalifoux L., Hunt R.D., 1971, Peribáñez M.A. et al., 2001).

Для определения вида дирофилярий, удаленных у людей, проводили морфологическое и гистологическое исследования нематод (Orihel T.C., Eberhard M.L., 1998).

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводился по стандартным этапам. Результаты учитывали на анализаторе «Opysys MR» фирмы Dynex. Проведен ROC-анализ диагностической эффективности ИФА с помощью программного обеспечения MedCalc.

Для получения температурных моделей дирофиляриоза применен метод математического моделирования. За образец взята климатическая модель Slocombe JOD, Surgeoner GA, Srivastava (1989), которая основана на влиянии среднесуточной температуры воздуха на скорость развития личинок дирофилярий в комарах с порогом в 14°C. При температуре выше пороговой накапливаются единицы развития дирофилярий (ЕРД). Для развития личинок до инвазионной стадии необходима сумма в 130 ЕРД. Модель сформирована с учетом того, что 130 ЕРД должны накопиться в срок, не превышающий 30 дней.

Для расчета ЕРД использовалась формула (1):

$$ЕРД = \begin{cases} \left(\frac{T_{min} + T_{max}}{2} \right) - 14 & \text{если } (T_{min} + T_{max})/2 > 14 \\ 0 & \text{если } (T_{min} + T_{max})/2 \leq 14 \end{cases}, \quad (1)$$

где ЕРД – единицы развития дирофилярий; T_{min} минимальная и T_{max} максимальная суточные температуры.

Рассчитывали критерий корреляции Пирсона с помощью программного обеспечения MedCalc.

Для пробоподготовки к масс-спектрометрическому анализу имаго *D. repens* и *D. immitis* отмывали, гомогенизировали, экстрагировали 70% муравьиной кислотой. Затем к пробе (100 µl) добавляли 50 % ацетонитрил (20-50 µl), пипетировали, центрифугировали (2 минуты при 13000 об/мин). Один µl супернатанта образца наносили на стальную пластину (Bruker Daltonics) в двух последовательностях, сушили (2-7 минут при +18 +25° С). На образец наносили 1 µl матрицы СНСА, испаряли жидкую фракцию (2-7 минут при +18 +25° С). После чего белки анализировали в приборе Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) с системой MALDI Biotyper.

Статистическая обработка данных проведена при помощи программных пакетов BioStat 5.2.5.0, MedCalc 13.0.2, Microsoft Excel 2010. Статистическую погрешность вычисляли с учетом среднего квадратичного отклонения качественных признаков (m). Для графического

отображения вычисленных величин использовались гистограммы, графики, круговые и пузырьковые диаграммы.

3. Эпизоотологическая и эпидемиологическая ситуации по дирофиляриозу в ряде субъектов Российской Федерации

3.1. Инвазированность собак дирофиляриозом. За период с 2008 по 2013 гг. обследовано 2364 собаки, микрофиляриемия выявлена у 281 собаки, экстенсивность инвазии составила $11,9 \pm 0,7$ % (Таблица 2). Собак в зависимости от типа содержания разделили на 3 группы: домашние собаки частных владельцев, безнадзорные животные, содержащиеся в приюте, и служебные собаки, работающие в силовых ведомствах РФ.

Таблица 2. Зараженность собак дирофиляриями на некоторых территориях РФ

Территория	Тип содержания и хозяйственного предназначения	Количество обследованных собак	Из них положительных	
			абс.	%
Республика Калмыкия	Домашние	13	1	$7,7 \pm 10,0$
	Служебные	49	9	$18,4 \pm 5,5$
Всего в Республике Калмыкия		62	10	$16,1 \pm 4,7$
Краснодарский край	Домашние	72	11	$15,3 \pm 4,3$
	Служебные	16	7	$43,8 \pm 12,4$
Всего в Краснодарском крае		88	18	$20,5 \pm 4,3$
г. Ростов-на-Дону	Домашние	1419	119	$8,4 \pm 0,7$
	Служебные	55	6	$10,9 \pm 4,2$
	Безнадзорные	84	15	$17,9 \pm 4,2$
	Всего в г. Ростове-на-Дону	1558	140	$8,9 \pm 0,7$
Другие административно-	Домашние	343	63	$18,4 \pm 2,1$

территориальные образования Ростовской области				
Всего в Ростовской области		1901	203	10,7±0,7%
Республика Адыгея	Домашние	96	8	8,3±2,8
Республика Карачаево- Черкесия	Домашние	42	0	0
Астраханская область	Служебные	40	5	12,5±5,3
Новгородская область	Домашние	48	6	12,5±4,8
	Служебные	87	31	35,6±5,1
Всего в Новгородской области		135	37	27,4±3,8
ИТОГО		2364	281	11,9±0,7

В Ростове-на-Дону обследованы на дирофиляриоз собаки частных владельцев 73 пород, которых разделили на 5 групп: охотничьи, бойцовые, служебные, комнатно-декоративные и беспородные. Наиболее низкая экстенсивности инвазии дирофиляриозом выявлена у собак комнатно-декоративных пород – 1,3±0,6 %. Зараженность данным паразитом охотничьих и бойцовых пород практически одинаковая (11,0±2,8 % и 11,8±3,7 % соответственно). Наиболее высокая ЭИ дирофиляриозом отмечалась у служебных пород 17,2±1,9 % и беспородных животных 22,7±5,1 %. В 2008-2012 гг. наблюдалось снижение экстенсивности инвазии дирофиляриозом собак разных пород, при сохраняющейся высокой зараженности беспородных (в сравнении результатами исследований, проведенных в начале 2000х гг. Бескровной Ю.Г., 2009). Это связано с тем, что за 12 лет в г. Ростове-на-Дону повысилась культура содержания породистых собак (применение профилактических противогельминтных и репеллентных средств).

Обследованы на дирофиляриоз 84 собаки Центра Безнадзорных Животных г. Ростов-на-Дону. ЭИ дирофиляриозом в данном мегаполисе у бездомных собак более чем в 2 раза превышает ЭИ этим филяриатозом домашних собак: 17,9±4,2 % против 8,4±0,7 %. Что указывает на необходимость усиления мер контроля за бездомными собаками как за значимыми источниками дирофиляриоза и ужесточения ответственности за соблюдением правил содержания животных.

За период наблюдения показатель экстенсивности инвазии дирофиляриозом домашних собак из гг. Новочеркасск, Цимлянск, Волгодонск, Белая Калитва, Миллерово, Зерноград,

Шахты Ростовской области составил $18,4 \pm 2,1$ %. На Рисунке 1 представлена карта распространения дирофиляриоза домашних собак в Ростовской области. Для картографирования использовались собственные данные и данные литературы об инвазированности собак дирофиляриозом в г. Таганроге, г. Шахты и п. Казачьи Лагери (Фисько М.А., Фирсов Н.Ф., 2006, Фисько, М.А., 2008, Ярошенко Н. В., 2010, Kartashev V. et al., 2011).

Высокая зараженность собак дирофиляриями в Ростовской области связана с благоприятными климатическими условиями, обилием переносчиков и с тем, что значительная часть обследованных животных содержится в частном секторе, где они подвержены высокому риску заражения дирофиляриозом.

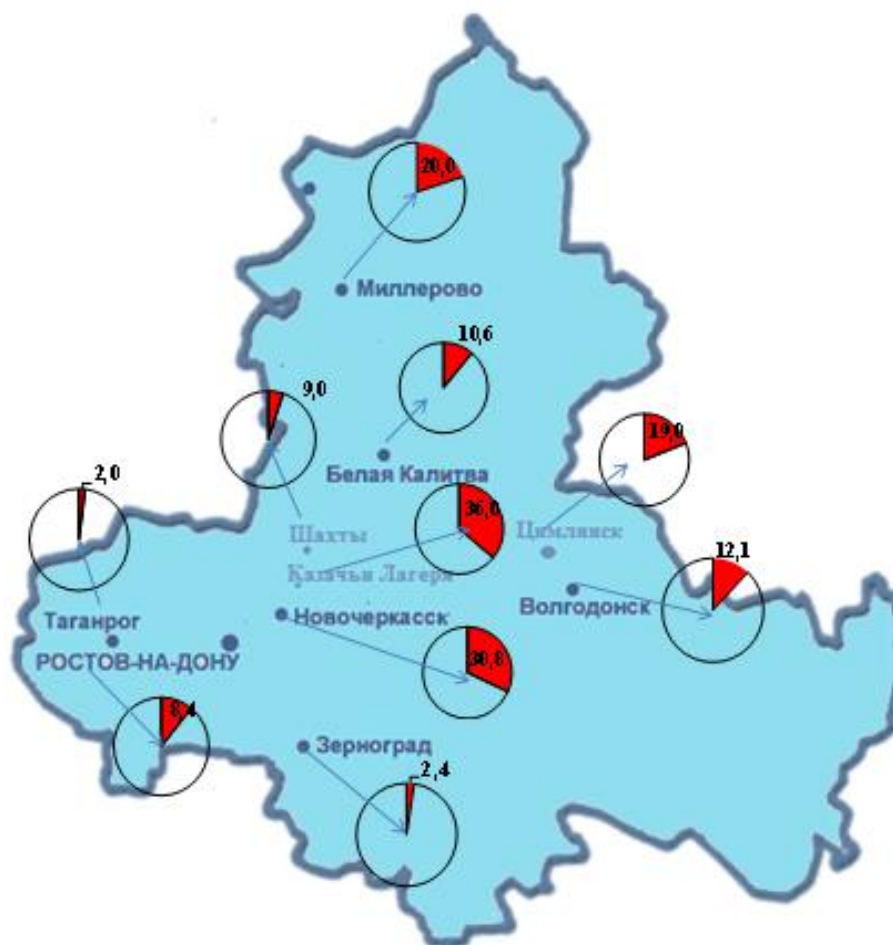


Рисунок 1. Экстенсивность инвазии собак дирофиляриозом в Ростовской области (в процентах)

Используя результаты собственных исследований и данные литературы о зараженности собак дирофиляриями в Астраханской, Волгоградской областях, Республиках Дагестан, Республике Северная Осетия (Шинкаренко А.Н., 2004, Игнатова, Д.Ю., 2007, Аракельян, Р.С., 2007, Трунова, С.А, 2008, Багаева У.В., Бочарова М.М., 2008, Ермилов В.В.и др., 2010,

Колесников, П.В., 2008) создана карта распространения дирофиляриоза собак на юге России (Рисунок 2).

На юге России сохраняется высокая зараженность окончательных хозяев дирофиляриями. Этому способствуют высокая численность окончательных и промежуточных хозяев, благоприятный для развития возбудителей и переносчиков климат и недостаточный объем проводимых профилактических мероприятий.

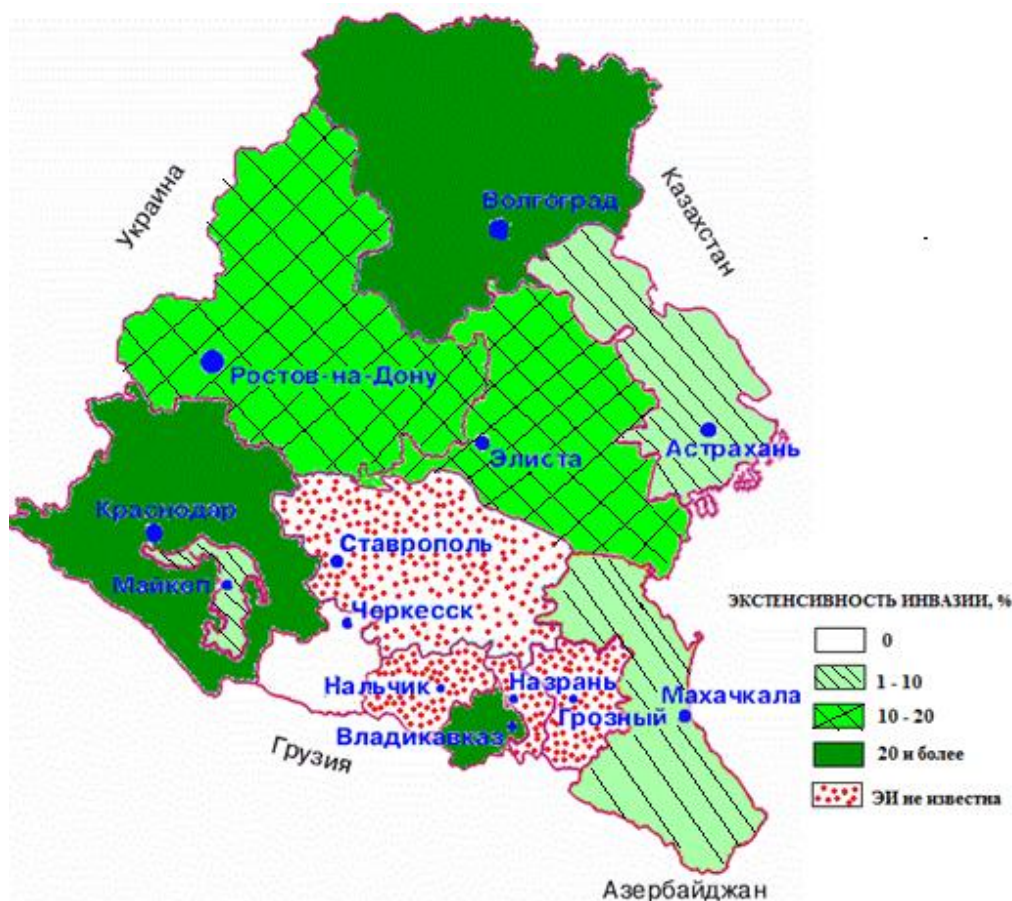


Рисунок 2. Экстенсивность инвазии собак дирофиляриозом на юге России

На дирофиляриоз обследовано 247 служебных собак с территорий: Ростовской, Новгородской и Астраханской областей, Республики Калмыкия и Краснодарского края. Дирофиляриоз выявлен у 58 животных ($23,5 \pm 2,7$ %). Установлено, что инвазированность дирофиляриозом служебных собак значительно превышает аналогичный показатель среди домашних собак на этих же территориях. Служебные собаки в связи с групповым вольерным содержанием подвергаются высокому риску заражения дирофиляриозом. Фактором, способствующим распространению дирофиляриоза, является недостаточное ветеринарное обслуживание. Миграции рабочих животных силовых структур могут способствовать распространению изучаемого гельминтоза на новые территории. Проведение регулярных плановых мероприятий: химиопрофилактики, лабораторного обследования и лечения

выявленных случаев заболевания, позволят оптимизировать ветеринарное обслуживание и локализовать очаги дирофиляриоза.

3.2. Инвазированность кошек дирофиляриозом. В Ростовской области на наличие личинок дирофилярий исследованы 632 пробы крови кошек. Микрофиляриемия крови наблюдалась в $0,5 \pm 0,3$ % случаев, из чего можно сделать вывод, что кошки в трансмиссии данного зооноза в Ростовской области играют незначительную роль.

3.3. Ксеномониторинг дирофиляриоза. Исследованы 6071 особь кровососущих комаров, отловленных в Ростовской, Астраханской, Новгородской областях, Краснодарском крае и Республике Адыгея (Таблица 3). Личинки дирофилярий обнаружены у 85 насекомых ($1,4 \pm 0,2$ %). Личинки дирофилярий выявлены у $2,3 \pm 0,3$ % комаров р. *Aedes*, $1,9 \pm 0,4$ % р. *Culex*. Экстенсивность заражения комаров р. *Anopheles* микрофиляриями ниже $0,6 \pm 0,1$ %, у самок р. *Culiseta* микрофилярии не обнаружены.

Таблица 3. Зараженность комаров дирофиляриями на некоторых территориях РФ

Территория	Род	Количество исследованных комаров	Из них положительных	
			абс.	%
Астраханская область	<i>Anopheles</i>	470	4	$0,9 \pm 0,4$
Краснодарский край	<i>Aedes</i>	685	7	$1,0 \pm 0,4$
Краснодарский край	<i>Culex</i>	582	4	$0,7 \pm 0,3$
Краснодарский край	<i>Anopheles</i>	115	0	0,0
Всего в Краснодарском крае		1382	11	$0,8 \pm 0,2$
Республика Адыгея	<i>Aedes</i>	2	0	0,0
Республика Адыгея	<i>Culex</i>	16	0	0,0
Республика Адыгея	<i>Anopheles</i>	172	1	$0,6 \pm 0,6$
Всего в Республике Адыгея		190	1	$0,5 \pm 0,5$
Ростовская область	<i>Aedes</i>	1014	37	$3,6 \pm 0,6$
Ростовская область	<i>Culex</i>	736	21	$2,9 \pm 0,6$
Ростовская область	<i>Anopheles</i>	1841	8	$0,4 \pm 0,1$

Всего в Ростовской области		3591	63	1,8±0,2
Новгородская область	<i>Aedes</i>	236	1	0,4±0,4
Новгородская область	<i>Anopheles</i>	115	2	1,7±1,2
Новгородская область	<i>Culiseta</i>	87	0	0,0
Всего в Новгородской области		438	3	0,7±0,4
ИТОГО		6071	85	1,4±0,2

В Ростовской области комары для исследования собраны в 16 территориальных единицах (Таблица 4).

Таблица 4. Зараженность комаров дирофиляриями в Ростовской области

Район / Городской округ	Род	Количество исследованных комаров	Из них положительных	
			абс.	% ± m
Азовский	<i>Aedes</i>	43	1	2,3±2,3
	<i>Culex</i>	18	1	5,6±5,4
	<i>Anopheles</i>	185	1	0,5±0,5
Аксацкий	<i>Aedes</i>	3	1	33,3±27,2
	<i>Culex</i>	160	3	1,9±1,1
	<i>Anopheles</i>	158	1	0,6±0,6
Белокалитвинский	<i>Culex</i>	127	4	3,1±1,5
	<i>Anopheles</i>	32	0	0,0
Волгодонской	<i>Aedes</i>	25	2	8,0±5,4
	<i>Culex</i>	118	4	3,4±1,6
	<i>Anopheles</i>	138	1	0,7±0,7
Зерноградский	<i>Aedes</i>	16	0	0,0
	<i>Anopheles</i>	140	1	0,7±0,7
Красносулинский	<i>Aedes</i>	226	9	4,0±1,3
	<i>Culex</i>	125	1	0,8±0,8
	<i>Anopheles</i>	511	2	0,4±0,3
Октябрьский	<i>Culex</i>	40	2	5,0±3,4
	<i>Anopheles</i>	189	1	0,5±0,5

Пролетарский	<i>Aedes</i>	351	16	4,6±1,1
Сальский	<i>Anopheles</i>	250	1	0,4±0,4
Усть-Донецкий	<i>Aedes</i>	3	0	0,0
	<i>Anopheles</i>	40	0	0,0
Цимлянский	<i>Anopheles</i>	17	0	0,0
г. Таганрог	<i>Aedes</i>	136	4	2,9±1,4
	<i>Culex</i>	6	1	16,7±15,2
	<i>Anopheles</i>	164	0	0,0
г. Новошахтинск	<i>Culex</i>	13	0	0,0
	<i>Anopheles</i>	17	0	0,0
г. Каменск	<i>Aedes</i>	210	4	1,9±0,9
г. Ростов-на-Дону	<i>Aedes</i>	1	0	0,0
г. Шахты	<i>Culex</i>	129	5	3,9±0,7
ИТОГО		3591	66	1,8±0,2

Комары, зараженные дирофиляриями, найдены на всех исследованных территориях Российской Федерации, уровень зараженности насекомых данным гельминтом различался. Наиболее высокая зараженность комаров личинками дирофилярий выявлена в Ростовской области (1,8±0,2 %), наименьшая в Республике Адыгея (0,5±0,5 %). В Ростовской области наибольшее количество положительных проб выявлено: в Пролетарском районе (4,9±1,2 %) и в г. Шахты (3,9±1,7%), наименьшее количество - в зерноградском (0,6±0,6 %) и Сальском районах (0,4±0,4 %). Различия в уровнях инвазированности комаров дирофиляриями обусловлены таксономическим составом исследованных насекомых, показателями экстенсивности инвазии дирофиляриозом окончательных хозяев на данной территории, и близостью мест сбора проб к очагам дирофиляриоза.

3.4. Дирофиляриоз человека. Проведен анализ анкетных данных 75 жителей Ростовской области, обратившихся с 2008 по 2013 гг. по поводу дирофиляриоза в структуры ФБУН Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора. Отмечено, что в период с 2000 г. по 2007 г. (Бескровная Ю.Г., 2009) в Ростовской области регистрировался высокий показатель инвазированности человека дирофиляриозом, а с 2008 г. - снижение количества больных с инвазией *D.repens*, что, наиболее вероятно, связано с регрессом зараженности собак дирофиляриями.

3.5. Картографирование дирофиляриоза человека в Российской Федерации. Проведен анализ 1093 официально зарегистрированных случаев дирофиляриоза человека по данным ФБУЗ «ЦГиЭ» Роспотребнадзора субъектов Российской Федерации от начала

регистрации по начало 2013 года. Наибольшее число больных дирофиляриозом выявлено в Ростовской (242 случая), Нижегородской (129), Волгоградской (93) областях и г. Москве (54). В 17 субъектах РФ дирофиляриоз человека не регистрировался, 16 субъектов РФ данные о заболеваемости человека дирофиляриозом не представили. На остальных территориях Российской Федерации, количество случаев удаления дирофилярии у человека составило от 1 до 50.

Проведено картографирование полученных данных, результаты которого отображены на Рисунке 3. На карте «Дирофиляриоз в Российской Федерации (число случаев у человека в разрезе административных территорий)» отмечены верхние границы потенциального риска заражения человека дирофиляриозом (по Дарченковой Н.Н. и др., 2009). Данные показывают, что география выявленных случаев шире, чем предполагаемые границы зоны низкого риска заражения дирофиляриозом.

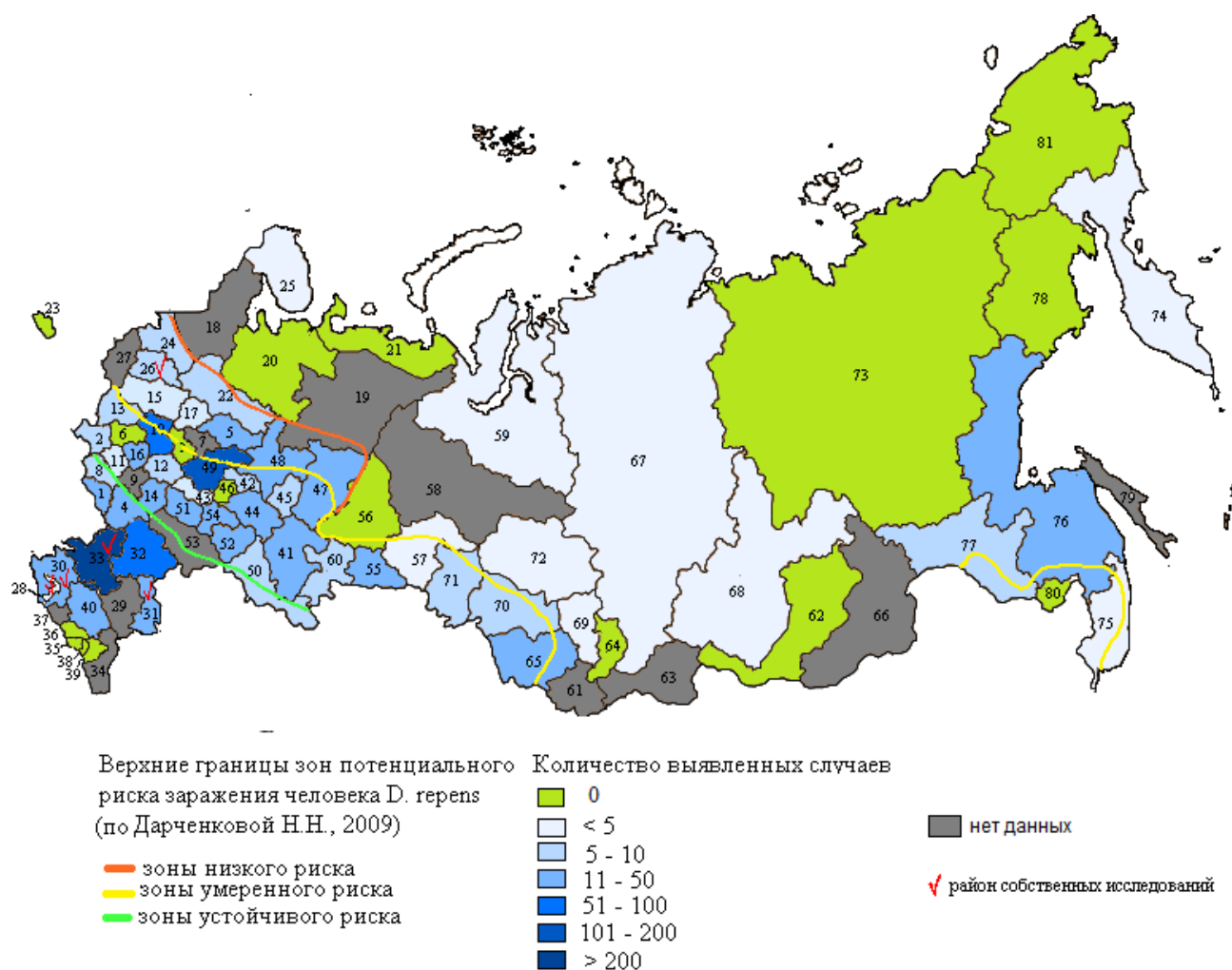


Рисунок 3. Дирофиляриоз в Российской Федерации (число случаев у человека в разрезе административных территорий)

4. Лабораторная диагностика дирофиляриоза

4.1. Иммуноферментный анализ с очищенным соматическим антигеном *D. immitis* и сыворотками крови собак. Разработан способ получения очищенного соматического антигена *Dirofilaria immitis* (патент на изобретение РФ №2525688). Для изготовления антигена (АГ) использовали головной конец половозрелой самки гельминта, который гомогенизировали ультразвуком и механически, экстрагировали в 0,25 М водном растворе сахарозы и очищали ацетоном. АГ разводили фосфатным буфером (рН 6,4) до концентрации белка 8 мкг/мл и сенсибилизировали на полистироловые планшеты в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали планшеты с АГ при температуре 37 °С в течение 1 часа и при 4° С - 12 часов. Далее планшеты отмывали субстратным буферным раствором с твин-20 (5 раз). Высушивали и использовали в ИФА по общепринятой методике.

4.1.1. Определение диагностической эффективности ИФА с очищенным соматическим антигеном *D. immitis* для диагностики сердечного дирофиляриоза собак. Диагностическую эффективность теста оценивали по результатам ИФА с сыворотками крови 150 собак. У 89 из обследованных обнаружены микрофилярии *D. immitis*, у 61 собаки микрофилярии *D. immitis* в крови отсутствовали.

Рассчитаны основные показатели диагностической значимости ИФА: специфичность теста - $86,9 \pm 2,8$ %, чувствительность - $93,3 \pm 2,1$ %, точность - $90,7 \pm 2,4$ %, распространенность антител в популяции - $59,3 \pm 4,0$ %, прогностическая ценность положительных результатов - $91,2 \pm 2,3$ %, прогностическая ценность отрицательных результатов $89,8 \pm 2,5$ %. Проведен ROC-анализ диагностической эффективности теста, показатель AUC равен 0,876. Высокие показатели диагностической значимости ИФА с очищенным соматическим антигеном *D. immitis* свидетельствуют об его эффективности для диагностики сердечного дирофиляриоза у собак.

4.2 Определение диагностической эффективности ИФА с очищенным соматическим антигеном *D. repens* и сыворотками крови человека для диагностики кожного дирофиляриоза. Обследованы иммуноферментным методом на наличие антител IgG к *D. repens* сыворотки крови 129 пациентов, из которых у 57 диагноз дирофиляриоз установлен после хирургического удаления *D. repens*. Остальные 72 обследованных на дирофиляриоз пациента это инвазированные токсокарозом, эхинококкозом, лямблиозом и «условно-здоровые» лица.

Рассчитаны основные показатели диагностической значимости ИФА: чувствительность ($75,4 \pm 3,8$ %), специфичность ($88,9 \pm 2,8$ %), точность ($82,9 \pm 3,8$ %), распространенность антител

IgG к *D. repens* в популяции ($44,2 \pm 4,4$ %), прогностическая ценность положительного результата ($84,3 \pm 3,2$ %), прогностическая ценность отрицательного результата ($82,1 \pm 3,4$ %). Проведен ROC-анализ диагностической эффективности теста - показатель AUC равен 0,850. Высокие показатели диагностической значимости ИФА с очищенным соматическим антигеном *D. repens* свидетельствуют об его эффективности для диагностики дирофиляриоза у человека.

4.3. Масс-спектрометрия дирофилярий. Десять имаго дирофилярий (по 5 особей *Dirofilaria immitis* и *D. repens*) подвергнуты MALDI-TOF MS анализу. Анализ белковых экстрактов показал спектры с пиками высокой интенсивности в диапазоне 2 - 20 кДа. Качество спектров и интенсивности спектральных пиков согласуется у всех образцов одного вида (Рисунок 4).

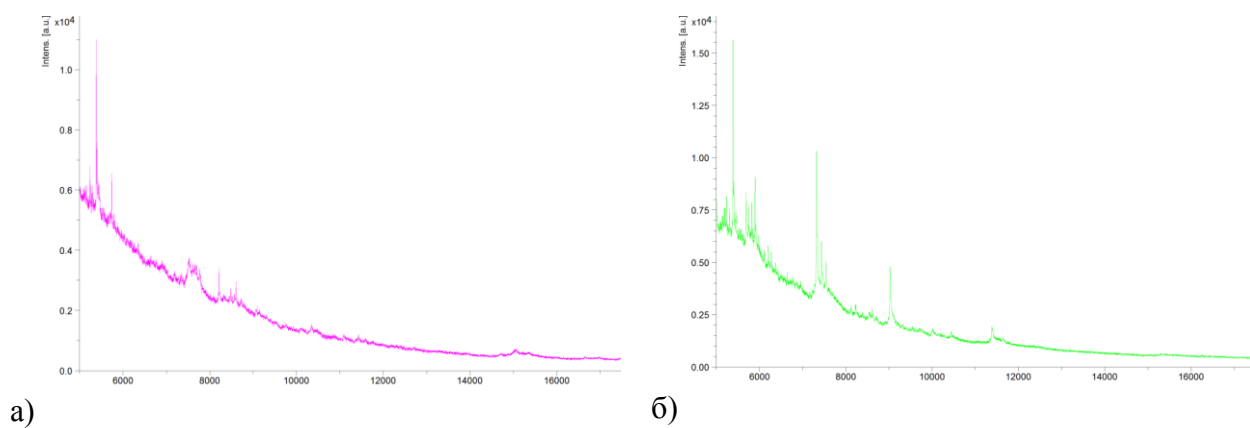


Рисунок 4. Белковые масс-спектры *D. repens* (а) и *D. immitis* (б)

Полученные профили спектров белков дирофилярий двух видов отличаются, что дает возможность дифференцировать по белковому профилю виды *D. immitis* и *D. repens*.

5. Температурное моделирование дирофиляриоза

5.1. Расчет ЕРД-модели дирофиляриоза для некоторых территорий России. Расчет ЕРД показал, что наибольшее число генераций личинок в комарах в течение года на исследованных территориях могло быть реализовано в г. Астрахани (в среднем 9,3 генераций в год) и г. Анапе (9). В г. Ростове-на-Дону могло быть реализовано от 5 до 10 (в среднем 7) генераций личинок. В г. Великий Новгород среднее число генераций личинок дирофилярий в комарах за 5 лет – 3,2, в разные годы показатели существенно отличались от 0 до 6.

При сопоставлении годовой динамики инвазированности собак дирофиляриозом и количества генераций дирофилярий в комарах в г. Ростове-на-Дону (Рисунок 5), показано, что ЭИ собак не зависит от количества генераций возбудителя.

Проведен корреляционный анализ - коэффициент корреляции Пирсона (r) составил: минус 0,45 ($P=0,0923$). Результаты анализа показали отсутствие положительной линейной корреляционной связи между количеством возможных генераций личинок дирофилярий в комарах и экстенсивностью инвазии собак дирофиляриозом в последующем году в г. Ростове-на-Дону, что свидетельствует о низкой значимости температурного моделирования для прогнозирования распространения дирофиляриоза.

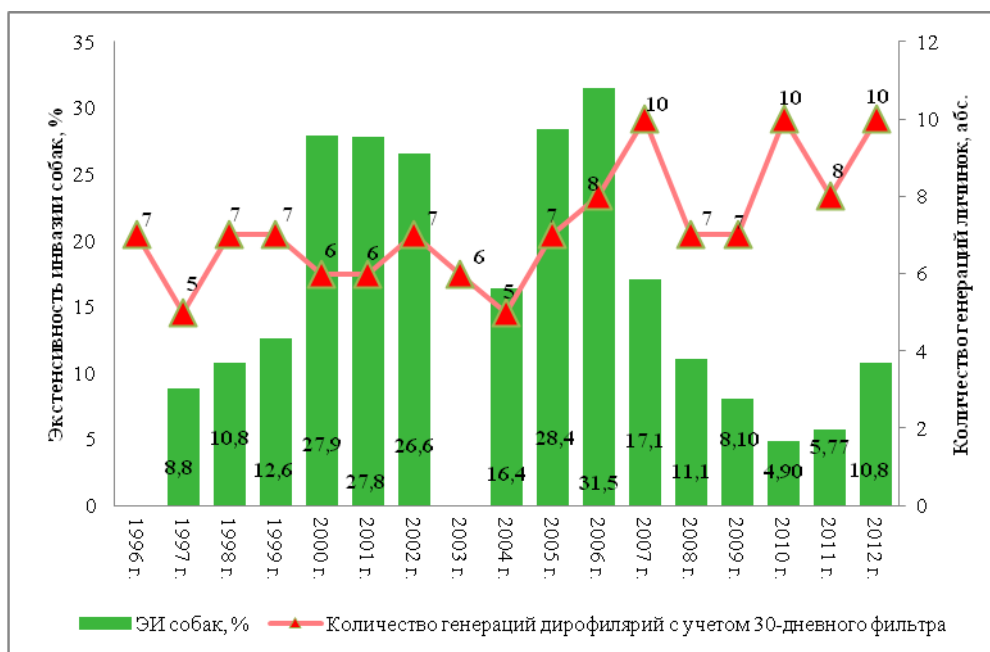


Рисунок 5. Динамика экстенсивности инвазий собак и количества генераций личинок дирофилярий в переносчике

На уровень зараженности собак дирофиляриями влияет не только температура и соответственно количество возможных генераций личинок в комарах за сезон передачи, но и обилие промежуточных и окончательных хозяев, вирулентность возбудителя, миграции, проводимые профилактические и противоэпидемические мероприятия и многие другие факторы. Следовательно, однофакторные температурные модели не дают полную картину.

5.2. Применение ЕРД-модели для профилактики дирофиляриоза. В соответствии с температурной ЕРД-моделью в г. Ростове-на-Дону за изученный 17-летний период наиболее раннее в сезоне трансмиссии дирофиляриоза окончание инкубации первой генерации личинок в комарах могло приходиться на 12 мая, крайняя дата окончания инкубации последней генерации на 30 сентября. В г. Астрахани соответственно на 8 мая и 30 сентября, в г. Анапе – 26 мая и 30 сентября. При этом среднесуточные температуры на юге России выше пороговых ($14\text{ }^{\circ}\text{C}$) в некоторые годы сохранялись до конца октября – начала ноября. Разрыв между датой окончания последней инкубации микрофилярий в комарах (30 сентября) и окончанием сезона трансмиссии (3 ноября) превосходит продолжительность жизни комаров в дикой природе (30 дней) – после 3

ноября отсутствуют факторы риска заражения животного. В г. В. Новгороде в соответствии с температурной моделью первая генерация личинок дирофилярий могла окончить развитие в комаре 7 июня, а последняя 18 августа. При этом в конце августа в В. Новгороде среднесуточные температуры резко снижаются и сезон трансмиссии дирофиляриоза заканчивается. Согласно температурной модели дирофиляриоза, на юге России (Ростов-на-Дону, Анапа и Астрахань) профилактическую микрофилярицидную терапию собак рационально проводить с 15 мая до 3 ноября, на северо-западе (г. В. Новгород) с 15 июня по 31 августа.

Температурные модели (расчет ЕРД), наряду с изучением зараженности собак и комаров дирофиляриями, позволят специалистам определить сроки химиопрофилактики дирофиляриоза собак на эндемичных территориях и обосновать необходимость диагностического контроля за животными, ввозимыми из эндемичных районов на новые территории.

ВЫВОДЫ

1. Определена вариабельность экстенсивности инвазии собак дирофиляриями на разных территориях. Экстенсивный показатель зараженности собак дирофиляриями составил: в Новгородской области - $27,4 \pm 3,8$ %, Краснодарском крае - $20,5 \pm 4,3$ %, Республике Калмыкия - $16,1 \pm 4,7$ %, Ростовской области - $10,7 \pm 0,7$ %, Республике Адыгея - $8,3 \pm 2,8$ %, Республике Карачаево-Черкесия – $0,0$ %.

2. Выявлены отличия зараженности собак дирофиляриями в зависимости от условий содержания и хозяйственного предназначения: показатели экстенсивности инвазии дирофиляриозом у безнадзорных и служебных собак превышают аналогичные показатели среди домашних собак на этих же территориях. Определена незначительная роль кошек в трансмиссии дирофиляриоза в Ростовской области: микрофиляриемия крови выявлена у $0,5 \pm 0,3$ % обследованных кошек.

3. Установлена зараженность кровососущих комаров (Diptera, Culicidae) дирофиляриями на разных территориях Российской Федерации. Зараженность комаров личинками *Dirofilaria spp.* составила: в Ростовской области – $1,8 \pm 0,2$ %, Астраханской области - $0,9 \pm 0,4$ %, Краснодарском крае - $0,8 \pm 0,2$ %, Новгородской области - $0,7 \pm 0,4$ %, Республике Адыгея - $0,5 \pm 0,5$ %.

4. Число случаев дирофиляриоза человека в Российской Федерации к началу 2013 г. составило 1093. Наибольшее число выявленных случаев отмечено в Ростовской (242 случая), Нижегородской (129), Волгоградской (93) областях. Разработаны карты распространения дирофиляриоза.

5. Разработан способ получения очищенного соматического антиген *Dirofilaria immitis* (патент №2525688). Установлены показатели диагностической эффективности иммунологического теста с антигеном *D. immitis* в отношении сердечного дирофиляриоза собак: специфичность - $86,9 \pm 2,8$ %, чувствительность - $93,3 \pm 2,1$ %, точность - $90,7 \pm 2,4$ %, AUC - 0,876.

6. Определена диагностическая эффективность иммунологического теста с антигеном *D. repens* для диагностики дирофиляриоза у человека (чувствительность - $75,4 \pm 3,8$ %, специфичность - $88,9 \pm 2,8$ %, точность - $82,9 \pm 3,8$ %, показатель AUC - 0,850)

7. Установлено, что метод масс – спектрометрии MALDI- TOF MS позволяет дифференцировать виды возбудителей дирофиляриоза *D. immitis* и *D. repens*.

8. Показана низкая значимость метода температурного моделирования для прогнозирования распространения дирофиляриоза. Определена возможность применения расчета единиц развития дирофилярий для установления сроков передачи и оптимизации профилактических мероприятий дирофиляриоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Нагорный, С.А. Дирофиляриоз на юге России / С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. докл. науч. конф. ВИГИС им. К.И.Скрябина. – М., 2010. – Вып. 11. – С. 308-312.

2. Криворотова, Е.Ю. Дирофиляриоз в городе-курорте Анапа / Е.Ю. Криворотова, С.А. Нагорный // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. докл. науч. конф. ВИГИС им. К.И.Скрябина. – М., 2011. – Вып. 12. – С. 253-254.

3. Нагорный, С.А. Дирофиляриоз – «новое» трансмиссивное заболевание / С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова // Матер. III ежегод. Всерос. конгр. по инфекционным болезням. – М., 2011. – Т. 9. Прил. № 1. – С. 262.

4. Нагорный, С.А. Особенности дирофиляриоза на юге России / С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова // Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период: тез. докл. Всерос. конф. – Ростов н/Д, 2011. – С. 171-174.

5. Нагорный, С.А. Служебные собаки и дирофиляриоз / С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. докл. науч. конф. ВИГИС им. К.И.Скрябина. – Вып. 12. – М., 2011. – С. 348-349.

6. Дирофиляриоз в Новгородской области / А.П. Росоловский, В.А. Пьяных, В.И. Игнатъева, О.Н. Матина, Е.А. Шевчук, Е.П. Данилова, Т.И. Твердохлебова, С.А. Нагорный, Л.А. Ермакова, Е.Ю. Криворотова // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 1-2. – С. 376.

7. Нагорный, С.А. Особенности эпидемиологии и эпизоотологии дирофиляриоза в городе Ростов-на-Дону и Ростовской области / С.А. Нагорный, Л.А. Ермакова, Е.Ю. Криворотова // Мед. паразитол. – 2012. – № 4. – С. 46-47.

8. Нагорный, С.А. Роль служебных собак в распространении дирофиляриоза / С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. докл. науч. конф. ВИГИС им. К.И.Скрябина. – М., 2012. – Вып. 13. – С. 266-269.

9. Нагорный, С.А. Эпизоотология и эпидемиология дирофиляриоза в Ростовской области / С.А. Нагорный, Л.А. Ермакова, Е.Ю. Криворотова // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 1-2. – С. 373.

10. Актуальные вопросы лабораторной диагностики дирофиляриоза / Е.Ю. Криворотова, С.А. Нагорный, Л.А. Ермакова, Ю.Г. Кулешова // Матер. V ежегодного Всерос. конгр. по инфекционным болезням. – М., 2013. – С. 217.

11. Дирофиляриоз в Новгородской области / А.П. Росоловский, В.А. Пьяных, В.И. Игнатъева, О.Н. Матина, Е.А. Шевчук, Е.П. Данилова, Т.И. Твердохлебова, С.А. Нагорный, Л.А. Ермакова, Е.Ю. Криворотова // Мед. паразитол.- 2013. – № 1. – С. 34-35.

12. Дирофиляриоз в Новгородской области / А.П. Росоловский, В.А. Пьяных, В.И. Игнатъева, О.Н. Матина, Е.А. Шевчук, О.Н. Емельянова, Т.И. Твердохлебова, С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова // Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период: тез. Всерос. конф. – Тюмень, 2013. – С. 140-141.

13. Дирофиляриоз собак в Новгородской области / С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова, А.П. Росоловский [и др.] // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. докл. науч. конф. ВИГИС им. К.И. Скрябина. – М., 2013. – Вып.14. – С. 264-266.

14. Криворотова, Е.Ю. Пораженность собак дирофиляриозом на юге России / Е.Ю. Криворотова, С.А. Нагорный, Е.К. Тарасов // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: матер. V Междунар. науч.-практ. конф. – Ростов н/Д: Изд-во ЮФУ, 2013. – С. 326-328.

15. Нагорный, С.А. Актуальные вопросы лабораторной диагностики дирофиляриоза / С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова, Л.А. Ермакова // Актуальные аспекты паразитарных заболеваний в современный период: тез. Всерос. конф. – Тюмень, 2013. – С. 115-116.
16. Нагорный, С.А. Человек в системе «человек-хозяин» при дирофиляриозе / С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова, Л.А. Ермакова // Паразитология в изменяющемся мире: матер. V с-да Паразитологического о-ва при РАН: Всерос. конф. с междунар. участием. – Новосибирск: Гарамонд, 2013. – С. 130.
17. Криворотова, Е.Ю. Масс-спектрометрия – новый тренд в диагностике паразитарных болезней (на примере дирофиляриоза) / Е.Ю. Криворотова, С.А. Нагорный // Матер. VI ежегод. Всерос. Конгр. по инфекционным болезням. – М., 2014. – С. 156.
18. Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI MS) – инструмент видовой идентификации дирофилярий / Е.Ю. Криворотова, С.А. Нагорный, А.В. Алешукина, С.О. Коршунов // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. докл. науч. конф. ВИГИС им. К.И. Скрябина. – М., 2014. – Вып. 15. – С. 121-124.
19. Нагорный, С.А. Возможность применения температурной модели дирофиляриоза (Slocombe JOD et al., 1989) в условиях России / С.А. Нагорный, Е.Ю. Криворотова // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. докл. науч. конф. ВИГИС им. К.И. Скрябина.– М., 2014. – Вып. 15. – С. 176-178.
20. Пат. 2525688 Рос. Федерация: МПК С07К/14 А61К 39/00 Способ получения очищенного соматического антигена *Dirofilaria immitis* / Нагорный С.А., Васерин Ю.И., Криворотова Е.Ю.; заявитель и патентообладатель: Федеральное бюджетное учреждение науки "Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии". – 2012138835/10; заявл. 10.09.2012; опубл. 20.08.2014, Бюл. № 23.
21. Comments in response to the authors of “Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in the Russian Federation—remarks concerning epidemiology” [Electronic resource] / L.A. Ermakova, S.A. Nagorny, E.Y. Krivorotova, N.Y. Pshenichnaya // Int. J. Inf. Dis. – 2014. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.04.024>. – 24.06.2014.
22. *Dirofilaria repens* in the Russian Federation: current epidemiology, diagnosis, and treatment from a federal reference center perspective / L.A. Ermakova, S.A. Nagorny, E.Y. Krivorotova [et al.] // Int. J. Inf. Dis. – 2014. – Vol. 23. – P. 47-52.