

На правах рукописи

СОГРИНА АНАСТАСИЯ ВИКТОРОВНА

**ДИРОФИЛЯРИОЗ СЛУЖЕБНЫХ СОБАК В
ПЕРМСКОМ КРАЕ (РАСПРОСТРАНЕНИЕ,
СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ,
КАРИОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИГЕНОВ
DIROFILARIA IMMITIS И
ПРОТИВОПАЗИТАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ)**

Специальность: 03.02.11 – паразитология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2017

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрабина»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Бережко Вера Кузьминична

Официальные оппоненты:

БЕСПАЛОВА Надежда Сергеевна,
доктор ветеринарных наук, профессор, профессор
кафедры паразитологии и эпизоотологии ФГБОУ
ВО «Воронежский государственный аграрный
университет имени императора Петра I»

РАКОВА Вера Михайловна,
кандидат биологических наук, старший
преподаватель кафедры тропической медицины и
паразитарных болезней ГБОУ ВПО «Первый
Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова» Минздрава
России

Ведущая организация: ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (г. Ростов-на-Дону)

Защита диссертации состоится «21» июня 2017 г. в 14:30 ч. на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой 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. Скрабина»

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

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 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

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Дирофиляриоз в последнее десятилетие получил широкое распространение на территории Российской Федерации, начиная с южных регионов, и заканчивая северными широтами с умеренно-континентальным климатом.

Для служебного собаководства данный вопрос является актуальным, так как ежегодно осуществляются командировки кинологовических расчетов в южные регионы страны, что способствует распространению возбудителей дирофиляриоза. Помимо механического, трофического, токсического, инокуляторного и аллергического действия на организм хозяина гельминты негативно влияют на метаболизм каждой отдельной клетки и ее ядра, приводя, в том числе, к кариопатическим последствиям. Исследования по кариопатическим изменениям при дирофиляриозе ранее не проводились, что и обусловило степень актуальности нашего исследования.

В связи с вышеизложенным, имеется необходимость изучения кариопатического действия самих дирофилярий и препаратов для терапии и профилактики дирофиляриозной инвазии у служебных собак с учетом минимализации возможных негативных последствий.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение распространения дирофиляриоза среди поголовья служебных собак Пермского края, проведение серологического мониторинга с применением соматического антигена-экстракта *D. immitis*, а также изучение кариопатических и гематологических изменений в органах лабораторных животных под действием этого антигена-экстракта и некоторых антигельминтных препаратов, разработка эффективной схемы лечения и профилактики дирофиляриоза служебных собак.

В задачи исследований входило:

- 1) Изучить распространение дирофиляриоза среди служебных собак Пермского края.
- 2) Получить соматический антиген-экстракт из половозрелых *Dirofilaria immitis* и определить в нем содержание белка.
- 3) Провести серологическое исследование на дирофиляриоз служебных собак Пермского края.
- 4) Исследовать действие антигена-экстракта *Dirofilaria immitis* на гематологические показатели лабораторных животных.
- 5) Изучить кариопатическое действие *Dirofilaria immitis* на клетки костного мозга и семенников лабораторных мышей.
- 6) Разработка терапии при дирофиляриозе в условиях служебного собаководства Пермского края.
- 7) Действие препаратов новомек, эпримек, диронет, мильбемакс и эндогард® на гематологические показатели лабораторных животных.
- 8) Кариопатические изменения клеток костного мозга и семенников белых мышей под воздействием этих препаратов.

Научная новизна. Впервые изучено распространение дирофиляриоза у служебных собак в Пермском крае и проведен серологический мониторинг по данному заболеванию. Проведена оценка влияния соматического антигена-

экстракта из половозрелых *D. immitis* на гематологические показатели лабораторных мышей; изучено его кариопатическое воздействие на организм, клетки костного мозга и семенников. Впервые установлено дозозависимое кариопатическое действие антигена-экстракта половозрелых *D. immitis* на процесс клеточного деления у лабораторных животных. Определено влияние антигельминтиков (новомека, эпримека, диронета, мильбемакса, эндогарда) на клетки костного мозга и семенников белых мышей. Разработана и успешно апробирована схема лечения дирофиляриозной инвазии у служебных собак.

Практическая и теоретическая ценность работы. Материалы диссертационной работы дополняют и расширяют сведения, имеющиеся в отечественной и зарубежной литературе, касающиеся взаимоотношения гельминтов и клеток хозяина. Представленные материалы используются для чтения лекций и проведения лабораторных занятий со студентами факультета ветеринарной медицины и зоотехнии по курсу «Паразитология и инвазионные болезни животных» по специальности «Ветеринария», а также для повышения квалификации ветеринарных врачей в ФГБОУ ВО Пермская ГСХА. Материалы диссертационной работы используются на курсах повышения квалификации ветеринарных специалистов в ФКОУ ВО Пермский институт ФСИН России. По результатам исследований разработаны методические рекомендации: «Диагностика, терапия, организация борьбы и профилактики с дирофиляриозом служебных собак в Пермском крае», одобренные Методической комиссией «Инвазионные болезни животных» секция «Зоотехнии и ветеринарии» Отделения сельскохозяйственных наук РАН, от 6 октября 2016 г., протокол № 3.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Распространение дирофиляриоза служебных собак в Пермском крае.
- Серологический мониторинг дирофиляриоза служебных собак в исследуемом регионе.
- Воздействие антигена-экстракта *D. immitis* на организм лабораторных животных, процесс клеточного деления в красном костном мозге и семенниках лабораторных животных.
- Действие препаратов новомек, эпримек, диронет, мильбемакс, эндогард на клетки красного костного мозга и семенников лабораторных животных.
- Терапия и профилактика дирофиляриоза служебных собак в Пермском крае.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на:

Согрина А.В. Сивкова Т.Н. Паразитарные заболевания служебных собак города Перми. – Мат. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – Вып. 8–2007. –М. – С.332-335; Согрина А.В. Паразитарные заболевания собак и кошек г. Перми. – Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – М. – 2008. – С.454-455; Согрина А.В. Дирофиляриоз служебных собак в Пермском крае. – Систематика и экология паразитов. – М.–2014. – С.294-295; Согрина А.В. Сивкова Т.Н. Паразитарные

зоонозы служебных собак города Перми. - Известия Самарского научного центра Российской академии наук. –2014. – том 16. - №5(1). – С.518-520; Sogrina A., Berezhenko V., Sivkova T., Napisanova L., Prohorova T. Pathology of testes cells in white mice after impact of Novomek. – VI International Scientific Agricultural Symposium “AGROSYM 2015” Jahorina, October 15-18, 2015. – P. 1788-1790; Согрин А.В. Сивкова Т.Н. Паразитарные болезни домашних плотоядных города Перми в 2014 году. – Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2015. – С.405-407; Согрин А.В., Бережко В.К., Сивкова Т.Н., Написанова Л.А. Патологии мейоза клеток семенников белых мышей под воздействием соматического антигена *Dirofilaria immitis*. – Естественные и математические науки в современном мире / Сб. ст. по материалам XXVII междунар. науч.-практ. конф. № 2 (26). Новосибирск: Изд. «СибАК», 2015. – С. 176-184; Согрин А.В. Изменение гематологических показателей у белых мышей под воздействием препарата Эндогард. – Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – М. –2016. – С. 441-446; Доронин-Доргелинский Е.А., Согрин А.В. Проблемы организации борьбы с диروفилариозом в Российской Федерации. – Пермский аграрный вестник. – Пермь. –2016.- №3. – С; Доронин-Доргелинский Е.А., Сивкова Т.Н., Согрин А.В. Анализ причин распространения паразитарных зоонозов среди населения Пермского края. – Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – М. – 2016. – С.26-29; Согрин А.В. Ситуация по диروفилариозу служебных и охотничьих собак в Пермском крае за 2015 год. – Фауна и экология паразитов, Российская академия наук, том XLIX – М. – 2016. – С. 169-170.

Личный вклад соискателя. Представленная диссертационная работа является результатом многолетних (2007-2016 гг.) научных исследований автора. Исследование крови служебных собак, проведение серологического мониторинга диروفилариоза служебных собак методом иммуноферментной реакции (ИФР), сбор статистического и патологического материала, эксперименты по изучению кариопатического действие антигена-экстракта *D. immitis* и некоторых противопаразитарных препаратов на процесс деления клеток у лабораторных животных выполнены диссертантом лично.

Работа выполнялась при консультативном руководстве доктора биологических наук, профессора В.К. Бережко.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 научных статей, в которых изложены основные положения и выводы по изучаемой проблеме, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах компьютерного текста. Список использованной литературы включает 209 источников, в том числе 65 иностранных. Работа иллюстрирована 31 таблицей и 42 рисунками. Все представленные в диссертационной работе микрофотографии являются оригинальными авторскими работами.

1. Обзор литературы

Представлены литературные данные по распространению диروفилариоза, патогенезе инвазии, гематологических показателей, кариопатическом действии нематод и терапии диروفилариоза.

2. Характеристика региона исследований

За период 1915-2008гг. в литературе было описано более 550 случаев дирофиляриоза человека в РФ. Также было опровергнуто существовавшее долгие годы мнение, что человек является биологическим тупиком инвазии, так как появилось описание случаев обнаружения половозрелых филярий и микрофилярий у человека. В Пермском крае по данным «Центра гигиены и эпидемиологии по Пермскому краю» дирофиляриоз человека регистрируют с 2013г. К концу 2015 г. зафиксировано 14 случаев кожного дирофиляриоза. Успешная борьба с дирофиляриозом невозможна без изучения вопросов распространения инвазии среди восприимчивых животных, к которым, в первую очередь, относятся собаки.

Пермский край расположен на западных склонах Среднего и Северного Урала. С севера край граничит с Республикой Коми, с западной стороны располагается Коми-Пермяцкий автономный округ, который на данный момент входит в состав Пермского края, а также Кировская область и Удмуртская республика. С южной границы находится Республика Башкортостан, с востока вдоль всей границы протянулась Свердловская область. Пермский край протянул свои границы с севера на юг почти на 600 км. Самая северная точка зафиксирована под 61°39' северной широты, самая южная — 56°06' с.ш. С запада на восток регион простирается более чем на 300 км – от 53°43' до 59°39' восточной долготы. Общая площадь Пермского края составляет 127,5 тыс.км². Рельеф региона отличается большим разнообразием. Западная часть (примерно 75% территории) расположена на северо-восточной окраине Восточно-Европейской платформы и Предуральском краевом прогибе. Здесь преобладает равнинный и низменный рельеф. Восточная часть региона, по большей части – горная. Включает в себя западные склоны южной части Северного и северной части Среднего Уральского хребта. Водная сеть Пермского края представлена различными пресноводными водоемами. По классификации, принятой А.М. Комлевым и Е.А. Черных (1984), в регионе расположены 2 большие (Кама и Чусовая), 40 средних и около 29 000 малых рек. По сведениям, представленным А.Г. Вороновым и др. (2014), значительную роль в формировании климата региона играют Уральские горы, которые задерживают влажные массы воздуха, приходящие с Атлантического океана. В восточных районах, расположенных вдоль Уральского хребта, осадков выпадает больше на 100-200 мм в год по сравнению с западными и южными районами. Продолжительность безморозного периода здесь меньше на 30-40 дней, а толщина снежного покрова больше.

В Пермском крае встречаются мезоклиматы (местные климаты) городов, крупных водохранилищ, возвышенных и низменных ландшафтов. В г. Пермь выражен городской мезоклимат, особенность которого заключается в следующем: в течение всего года температура воздуха в центральной части города на 0,5 -1°С выше окрестностей. Зафиксировано меньшее количество дней с сильными ветрами. Мезоклимат крупных водохранилищ характеризуется более высокой температурой воздуха (выше на 4-5°С) при резких кратковременных похолоданиях. Весной после ледохода понижением температуры в прибрежной зоне. Климат Пермского края континентальный, с

холодной продолжительной и снежной зимой и теплым коротким летом. Среднемесячная температура воздуха самого холодного месяца (января) – 18,9°C в северной и -14,9°C в южной части края. Самым теплым месяцем в регионе является июль. Средняя температура июля на северо-востоке Пермского края составляет + 15°C, а на юго-западе + 18,5°C. Абсолютный максимум температуры достигал + 38°C.

Таким образом, природно-климатические условия Пермского края являются приемлемыми для развития дирофиляриоза, а с учетом мезоклиматов и масштабно развитой водной сети, обширным заболачиванием территории региона, можно утверждать о существовании благоприятной среды для интенсивного распространения инвазии.

1. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2. Материалы и методы

Материалами для исследований служили половозрелые дирофилярии *D. immitis* от естественно инвазированных собак г.Перми; соматический антиген-экстракт из половозрелых дирофилярий; объектами для данной работы послужили лабораторные белые нелинейные мыши и служебные собаки Пермского края; кровь служебных собак для проведения исследований на наличие микрофилярий и проведение серомониторинга; кровь от мышей для проведения гематологического анализа; антитела диагностические IgG сыворотки крови собак, меченные пероксидазой (конъюгат), производство компании «Хема» г. Москва лот 410; мазки-отпечатки послойных срезов красного костного мозга и семенников белых нелинейных мышей после воздействия на них антигеном-экстрактом из *D. immitis* и антигельминтными препаратами.

2.2.1. Изучение распространения дирофиляриоза служебных собак в Пермском крае. Серологический мониторинг

Изучение распространения дирофиляриоза среди служебных собак Пермского края проводили исследованием проб венозной крови собак разного пола, возраста, породы и служебного направления с 2007 по 2016 гг. на основании обнаружения личинок дирофилярий методом концентрации.

Для дифференциации видовой принадлежности микрофилярий проводили микроскопическое исследование препаратов, окрашенных методом Романовского-Гимза.

В общей сложности обследовали 562 служебные собаки, содержащиеся в питомниках Центра кинологической службы ГУ МВД России по Пермскому краю, питомника института ФСИН г. Пермь, исправительным колониям г. Пермь, питомника отдела МВД России по Краснокамскому району Пермского края, УФСКН по Пермскому краю. Были обследованы служебные собаки таких пород, как немецкая, кавказская, среднеазиатская, бельгийская, восточно-европейская овчарки, лабрадор-ретриверы, русские охотничьи спаниели, ротвейлеры, ягд-терьеры, босероны в возрасте от 6 мес. до 10 лет, обоего пола.

В 2007-2009 гг. исследовали 157 проб стабилизированной периферической крови собак, принадлежащих ФСИН РФ по Пермскому краю, зональному

центру кинологической службы главного управления МВД по Пермскому краю; в 2010 г. – 50 животных, принадлежащих ЗЦКС ГУ МВД РФ по ПК; В 2011-2012 гг. исследовали 89 проб крови служебных собак ФСИН России по Пермскому краю, ЗЦКС ГУ МВД России по ПК, питомнику отдела МВД России по Краснокамскому району Пермского края, ФСКН ГНК РФ по ПК; В период 2013-2014 гг. на наличие микрофилярий исследовано 95 проб крови служебных собак центра кинологической службы ГУ МВД России по Пермскому краю, питомника института ФСИН г. Пермь, питомника отдела МВД России по Краснокамскому району Пермского края и животных, содержащихся в питомниках исправительных колоний г.Пермь; В 2015 г. нами было проведено исследование 115 проб крови служебных собак всех выше указанных питомников; В 2016 г. проверено 56 проб венозной крови служебных животных, принадлежащих ФСИН РФ по Пермскому краю.

Серозепизоотологический мониторинг проб крови от обследуемых животных проводили на базе ФГБНУ «ВНИИП им. К.И. Скрябина» с применением ИФР. С этой целью было исследовано 186 сывороток крови собак, предварительно обследованных на наличие микрофиляриемии. Сыворотки хранили при -20°C .

Постановку иммуноферментной реакции проводили в непрямом варианте с целью выявления антител в сыворотке крови служебных собак Пермского края. Параметры и режим постановки ИФР проводили по общепринятой методике, включающей следующие позиции: определение концентрации соматического антигена-экстракта из диروفиларий, необходимого для сенсibilизации полистироловых планшетов.

При выборе оптимальной концентрации белка антигена для сенсibilизации полистироловых планшетов нами были применены следующие концентрации: 10; 15; 25; 30 мкг/мл. Антиген-экстракт *D. immitis* разводили в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере рН 9,6. Сенсibilизация планшетов проводилась при температуре 4°C – 17-18 часов.

Конъюгат (антитела диагностические против IgG сыворотки крови собак) испытали в разведении 1:1000; 1:2500; 1:5000; 1:10000, время инкубации с конъюгатом 30; 40; 45 и 50 минут

Твердой фазой служили планшеты из полистирола (ГОСНИИМЕДПОЛИМЕР г. Москва).

Для определения оптимального титра исследуемых сывороток были испытаны разведения 1:50; 1:80; 1:100. Оптимальным титром считали разведение положительных и отрицательных контрольных сывороток с наибольшей разницей в оптической плотности.

Титрование исследуемых сывороток осуществляли фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) рН 7,2-7,4, с добавлением 0,05% твина – 20 и 0,05% бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Реакцию оценивали на автоматическом ридере Antos 2010 при длине волны 492 нм с применением программы Adap 1.6.

2.2.2. Гематологические исследования

Кровь от лабораторных белых нелинейных мышей собирали в момент цервикальной дислокации в количестве 200 мкл в одноразовые пластиковые пробирки «Impromini» с ЭДТА-К2 и исследовали с помощью автоматического гематологического анализатора Abacus junior vet с использованием программы «Mouse». Помимо этого, готовили мазки, которые фиксировали по Май-Грюнвальду и окрашивали азур-эозином по Романовскому. Затем микроскопировали и осуществляли подсчет лейкоцитарной формулы на 100 клеток на механическом счетчике лейкоцитарной формулы «ЗМА Киев» (1958) под иммерсионным объективом на микроскопе марки «Биомед-5».

2.2.3. Приготовление соматического антигена-экстракта из половозрелых *Dirofilaria immitis*

Соматический экстракт готовили по методу E.J. Rutenberg et al. с модификацией применительно к нашим условиям из свежемороженых половозрелых дирофилярий (*D. immitis*). Измельченные гельминты подвергались гомогенизации с последующим попеременным замораживанием и оттаиванием биоматериала до получения однородной гомогенной массы. Экстрагирование белков проводили с использованием фосфатно-солевого буферного раствора pH 7,2-7,4 в соотношении 1:10 на магнитной мешалке в условиях холодильной камеры при 4-6°C в течение 24-48 часов. Экстракт (надосадочную жидкость) получали центрифугированием при 12 тыс. об/мин. в течение 15-20 минут в центрифуге с охлаждением Optima TLX (настольная центрифуга, контролируемая микропроцессором Beckman Coulter International S.A.) В приготовленном антигене-экстракте определяли содержание белка по методу Laune на спектрофотометре при 280 нм, с калибровочной кривой на основании 5-ой фракции бычьего сывороточного альбумина.

2.2.4. Изучение кариопатического действия антигена-экстракта дирофилярий

Материалом для проведения исследования служили нелинейные белые мыши-самцы, массой 18-22 г, в количестве 36 голов, распределенных на 6 групп по 6 мышей в каждой, которым проводили однократное внутрибрюшинное введение соматического антигена-экстракта *D. immitis* в дозе 100 мкг белка на мышшь.

Контрольная группа оставалась интактной. Убой животных проводили через 4; 12; 24; 48 и 72 часа после введения антигена-экстракта.

Для изучения дозозависимого эффекта от инокуляции исследуемого биоматериала из *D. immitis* было проведено его однократное внутрибрюшинное введение мышам в дозах 100; 200; 300 и 1000 мкг белка/мышшь с последующим убоем через 12 часов.

У экспериментальных мышей выделяли костный мозг из грудины, семенники и готовили мазки-отпечатки, которые фиксировали по Май-Грюнвальду и окрашивали азур-эозином по Романовскому. Затем микроскопировали и осуществляли подсчет количества делящихся клеток, учитывали форму, размеры и окраску ядер.

Определение частоты встречаемости клеток с кариопатическими нарушениями и цитотоксическими эффектами проводили на отдельно лежащих и распластанных клетках с подсчетом не менее 1000 клеток на каждом препарате.

Оценку митотической активности клеток проводили на основании митотического индекса (МИ, %), который определяли по отношению числа делящихся клеток к общему числу клеток, видимых в препарате на момент исследования. Микроядра идентифицировали как хроматиновые округлые тела с гладким непрерывным краем, размером не более 1/3 ядра, которые располагались отдельно от основного ядра, но в одной плоскости, не преломляли свет, с интенсивностью окрашивания и рисунком хроматина, как у основного ядра. Кроме того, учитывали двуядерные клетки, фрагментацию и вакуолизацию ядра, раннее (преждевременное) разделение хроматид в профазе, патологии митоза, связанные с повреждением митотического аппарата и нарушением цитотомии.

Для статистической обработки результатов использовали пакет программ STATISTICA 6.

2.2.5. Изучение кариопатического действия антигельминтиков

Материалом для проведения исследования служили нелинейные белые мыши-самцы массой 18-22 г, которым согласно инструкции вводили подкожно новомек в дозах 200; 400 и 1000 мкг/кг, эпримек в рекомендованной по инструкции дозе – 200 мкг/кг, выпаивали таблетированные формы антигельминтиков диронет, мильбемакс и эндогард из расчета 1 таблетка на 10 кг массы животного. Диронет, мильбемакс и эндогард согласно инструкции, для животных массой менее 0,5 кг, непосредственно перед применением тщательно измельчали и смешивали с кипяченой водой.

Контрольная группа оставалась интактной. Животные находились на стандартном пищевом рационе, имели свободный доступ к воде и корму. Каждая группа состояла из 5 мышей.

Максимальная концентрация в крови большинства составляющих исследуемых препаратов достигается через 12 часов после введения, что и определило сроки убоя декапитацией экспериментальных животных. После вскрытия выделяли семенники и красный костный мозг из грудины, из которых готовили мазки-отпечатки, которые затем фиксировали по Май-Грюнвальду и окрашивали азур-эозином по Романовскому.

Затем мазки микроскопировали и осуществляли подсчет количества делящихся клеток, учитывали форму, размеры и окраску ядер. Анализ частоты встречаемости клеток с кариопатическими нарушениями и цитотоксическими эффектами проводили на отдельно лежащих и распластанных клетках с подсчетом не менее 1000 клеток на каждом препарате.

Для изучения митотической активности клеток использовали митотический индекс (МИ, %), который показывает отношение числа делящихся клеток к общему числу подсчитанных клеток.

Просмотр препаратов проводили на микроскопе Meiji при увеличении $\times 400$ и $\times 1000$ и фиксировали с помощью фотокамеры Vision.

Для статистической обработки результатов использовали пакет программ STATISTICA 6.

2.3. Результаты исследований

2.3.1. Распространение дирофиляриоза служебных собак в Пермском крае

По результатам проведенных исследований 562 проб венозной крови служебных собак разного пола, возраста, породы и служебного направления на наличие микрофилярий установили, что зараженность их в разные временные периоды неодинакова.

Так, в 2007-2009 гг. у собак микрофилярий не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии инвазии или ее протекания в скрытой форме, что невозможно определить методом концентрации. Впоследствии ситуация изменилась.

Начиная с 2010 г. мы регистрировали поражение служебных собак обоими видами дирофилярий. Так, из 50 обследованных животных у двух обнаружены личинки *D. immitis* и у двух других – *D. repens*. Из 89 обследованных животных за периоды 2011 – 2012 гг. у четырех служебных собак установлено поражение *D. repens*. Аналогичные исследования, проведенные в 2013-2014 гг. с использованием крови 95 служебных собак, показали зараженность 16 особей *D. repens*, что составляет 16,8%. В последующие два года при обследовании крови 115 и 56 собак из разных питомников установили поражение как *D. immitis*, так и *D. repens*. За 2015 г. выявлено одно животное, зараженное *D. immitis* и четыре особи, пораженные *D. repens*. Зависимость заражения нематодами от возраста, пола и породы мы не регистрировали.

Несмотря на то что служебные собаки вышеуказанных подразделений ежегодно обследовались нами на наличие микрофилярий и по результатам исследований проводили лечение больных животных, эпизоотологическая ситуация к 2016 г. по дирофиляриозу оставалась нестабильной, что подтверждают результаты наших последующих исследований.

При этом мы установили, что дирофиляриями были заражены не только животные, которые выезжали за пределы Пермского края, но и собаки, не покидающие территорию региона на протяжении всей жизни.

Все служебные собаки содержались в уличных вольерах. При клиническом осмотре у животных серьезных отклонений в состоянии здоровья не выявляли. Тем не менее, в крови большого количества собак были обнаружены микрофилярии.

Наши исследования показали преобладание у обследованного животного возбудителя кожного дирофиляриоза *D. repens*. Необходимо отметить, что в одном случае животное оказалось зараженным обоими видами гельминтов. У одной собаки из Краснокамского питомника отмечали повышенную утомляемость, отказ от работы, непереносимость физических нагрузок, что стало следствием поражения *D. immitis*.

В результате проведенных исследований нами подтвержден стойкий очаг дирофиляриоза в Пермском крае. При этом в 2015 г. микрофиляриемия у собак

из центра кинологической службы при ГУ МВД по Пермскому краю не выявлена, хотя в предыдущие годы заболевание в этом питомнике регистрировали регулярно. По нашему мнению, данная ситуация связана с тем, что на протяжении всего 2015 года ежеквартально животных обрабатывали комплексным препаратом, содержащим в своем составе макроциклический лактон – моксидектин.

Животных из Краснокамского питомника при МВД на протяжении последних пяти лет обрабатывали препаратами на основе перметрина и фипронила, что оказалось недостаточно для осуществления успешной профилактики дирофиляриоза.

Для проведения серозепизоотологического исследования методом ИФР с соматическим антигеном-экстрактом *D. immitis* были отобраны 186 сывороток крови собак различного пола, породы и возраста, из них 4 особи по результатам исследования методом концентрации и последующей идентификации были заражены – *D. immitis* и 9 – *D. repens*, 1 собака поражена обоими видами гельминтов, остальные животные на момент забора крови были свободны от микрофилярий.

Результаты ИФР показали, что не все собаки, в крови которых были обнаружены личинки *D. immitis* и *D. repens*, оказались серопозитивным. Из четырех проб с микрофиляриями *D. immitis* – одна дала отрицательный результат. Аналогичные исследования 9 проб крови собак с подтвержденным диагнозом кожного дирофиляриоза (микрофиляремия *D. repens*) показали в реакции один сомнительный результат. Сыворотка крови с микстинвазией *D. immitis* и *D. repens* прореагировала в ИФР отрицательно. По нашему мнению, отрицательные результаты как в первом, так и во втором случае связаны с большой ИИ, которая составила 4 тысячи личинок дирофилярий на 1 мл крови. При такой интенсивной микрофиляремии может происходить угнетение всех звеньев иммунной системы, что отразилось на выработке специфических антител.

Из 172 собак, у которых гельминтологическими методами микрофилярий в крови не выявляли, в ИФР показали следующий результат: 129 (75%) реагировали отрицательно, 8 (4%) проб сывороток – положительно, а 35 (20%) проб показали сомнительный результат. Положительный результат в ИФР среди проб крови собак, свободных от микрофилярий, можно объяснить разными причинами, а именно, наличием гельминта в организме, на антигены которого вырабатываются антитела, и отсутствием личинок вследствие применения препаратов, угнетающих активность дирофилярий (антигельминтики, антибиотики), а также паразитированием однополых особей, либо забором крови на раннем этапе заражения, когда антитела уже вырабатываются, а дирофилярии еще не достигли половой зрелости. Следует также учитывать тот факт, что цикл развития дирофилярий напрямую связан с жизненным циклом промежуточных хозяев, и как следствие температурным режимом, временем года и суток. Исходя из практики, обнаружить микрофилярии в крови у животных уличного содержания в зимний период на территории Пермского края никогда не удавалось. В период с середины марта

и до заморозков поздней осенью (октябрь) мы фиксировали микрофиляремию у служебных собак в данном регионе.

Достаточно высокую чувствительность соматического антигена-экстракта из половозрелых *D. immitis* в ИФР с сыворотками крови собак с подтвержденным диагнозом кожного дирофиляриоза (*D. repens*) можно объяснить значительным серологическим родством этих двух паразитов. Для дифференциальной диагностики этих паразитозов необходимо использовать очищенные антигены-экстракты. Сомнительный результат, полученный ИФР в 35 пробах сывороток собак, с одной стороны, может быть также следствием применения в ИФР неочищенного антигена *D. immitis*, а с другой, реагированием антигена-экстракта из *D. immitis* с антителами на другие виды гельминтов, в том числе – кишечных нематод, на наличие которых эти животные на момент взятия крови не были обследованы.

2.3.2. Воздействие соматического антигена-экстракта *D. immitis* на организм лабораторных мышей

Общее состояние животных находилось в пределах физиологической нормы во все периоды исследований.

Гематологические изменения в группе опытных мышей начинали регистрировать уже через 4 часа после введения антигена-экстракта, однако максимальное количество отклонений от нормы и контроля происходило через 24 часа. При этом в показателях лейкограммы наглядно отображены изменения, характерные для нормоэргического иммунного ответа. Через 4 часа после введения антигена и на протяжении первых суток эксперимента мы наблюдали ярко выраженный нейтрофильный ответ. Повышение числа нейтрофилов в крови, сдвиг лейкоцитарной формулы влево с увеличением числа «юных» форм указывает на усиление продукции нейтрофилов красным костным мозгом, что свидетельствует об иницировании неспецифического иммунного ответа. Данная реакция организма индуцирована введением антигена-экстракта и направлена, в первую очередь, на его элиминацию.

Через 24 часа от начала эксперимента мы фиксировали увеличение общего количества лейкоцитов до верхних границ нормы и отмечаем увеличение доли лимфоцитов и моноцитов, что свидетельствует об активации процесса выработки тканевых макрофагов. В конце эксперимента (72 часа) мы наблюдали, что общее количество лейкоцитов превышает аналогичный показатель по сравнению с контрольной группой незначительно за счет увеличения доли юных нейтрофилов и моноцитов.

В костном мозге наблюдали максимальные показатели активности деления клеток на введение антигена-экстракта уже через 4 часа, впоследствии показатели опытных групп приближались к значению контроля. Сравнивая соотношение отдельных фаз митотического процесса, мы установили значительное увеличение количества ана- и телофаз через 12 часов от начала эксперимента, что свидетельствует о блокировке процесса митоза на его завершающих стадиях.

Количество патологий делящихся клеток увеличилось в $16,18 \pm 7,45$ раз по сравнению с контролем через 4 часа. Максимальное их количество проявилось

через 12 часов и составило $18,05 \pm 9,03\%$. В последующие часы опыта процент патологий от количества делящихся клеток снизился и оставался примерно на одном уровне ($6,66 \pm 5,55 - 9,72 \pm 4,86\%$).

Среди отдельных патологий деления мы отмечали трехполюсные метафазы, многополюсные анафазы, неравнополюсные анафазы и анафазы с мостами. Данные факты свидетельствуют о нарушении, в первую очередь, функционирования клеточных центров и микротрубочек веретена деления. Повреждение самих хромосом, по всей видимости, происходило в незначительной степени.

В состоянии клеток семенников также наблюдали кариопатические последствия. Данные анализа частоты встречаемости клеток семенников с кариопатическими изменениями у мышей, подвергнутых воздействию белкового антигена-экстракта *D. immitis*, и в контрольной группе свидетельствуют о том, что активность деления клеток семенников по отношению к контролю незначительно возрастает через 4 часа после начала эксперимента, а затем показатель МИ снижается и через 48 часов достигает наименьших значений. Таким образом, мы наблюдаем угнетение пролиферативной активности клеток семенников. При этом процент клеток с нарушениями от общего числа клеток по сравнению с контролем аномально возрастает к 12 часам от начала эксперимента. При сравнении соотношения фигур деления клеток семенников во всех экспериментальных группах мышей, которым вводили антиген-экстракт, профазы и метафазы значительно преобладали над анафазами и телофазами при общем снижении митотической активности и увеличении числа патологий, связанных с повреждением хромосом и митотического аппарата. Таким образом, можно предполагать элиминирование патологических клеток посредством апоптоза, что и вызвало дисбаланс соотношения фигур деления в экспериментальных группах животных. Число клеток с нормальным ядром в контрольной группе мышей в несколько раз больше, чем в группах экспериментальных животных, которым вводили антиген-экстракт *D. immitis*, при этом из наблюдаемых патологий деления ядра в контроле лидирующее место занимает метафаза с отставанием хромосомы и анафаза-телофаза с мостом.

Известно, что патологические митозы в нормальных тканях встречаются в 2-3% клеток и менее. В экспериментальных группах мышей под воздействием антигена-экстракта *D. immitis* через 12 и 48 часов было выявлено наибольшее количество патологий делящихся клеток, среди которых преобладало отставание хромосом в метафазе. Данная патология возникает при повреждении хромосом в области кинетохора. Поврежденные хромосомы пассивно «дрейфуют» в цитоплазме и в итоге либо разрушаются и элиминируются из клетки, либо случайным образом попадают в одно из дочерних ядер, либо образуют микроядро, что мы и выявляли в ходе эксперимента.

В сравнении с интактной группой животных, у мышей, которым вводили антиген-экстракт *D. immitis*, появляются такие патологии как преждевременное расхождение хроматид в профазе, многополюсный митоз, мосты в ана-телофазе. Выявленные нарушения напрямую связаны с повреждением

хромосом и, как правило, приводят к генотипической разнородности дочерних клеток, а также нарушают течение завершающих стадий деления и задерживают цитокинез. Значительно возрастает количество клеток с агглютинацией хромосом. Такая патология часто встречается в опухолевых клетках и при воздействии митотических ядов. Набухая, хромосомы утрачивают правильные очертания и, склеиваясь поверхностями, образуют неправильные комковатые массы. Расхождения хромосом не происходит, и клетки часто гибнут.

При микроскопировании окрашенных мазков-отпечатков нам неоднократно встречалась патология деления ядра, которую мы идентифицировали, как полное нерасхождение сестринских хроматид и, поскольку данная патология не описана в литературе, назвали ее «Метафаза с тенью». По аналогии с классификацией патологий митоза по И.А. Алову (1972) предполагаем, что, также, как и нерасхождение хромосом, этот кариопатический эффект связан с нарушением кинетохорной области, либо с частичной дезорганизацией хромосомных нитей веретена.

В незначительном количестве за период исследования встречались формы нарушений, связанные с ненормальным течением цитотомии.

2.3.2.1. Дозозависимое действие соматического антигена-экстракта *D. immitis* на организм лабораторных мышей

Следующим этапом нашей работы было изучение зависимости интенсивности кариопатических последствий у лабораторных животных от дозы вводимого антигена по белку. Для этого мышам внутрибрюшинно однократно вводили соматический антиген-экстракт *D. immitis* в дозах 100; 200; 300 и 1000 мкг белка/мышь.

Результаты изменения гематологических показателей крови лабораторных мышей под воздействием антигена-экстракта *D. immitis* показали незначительные изменения в рамках физиологической нормы. В зависимости от дозы вводимого антигена-экстракта *D. immitis* фиксировали повышение количества лейкоцитов.

Так, после введения дозы 100 и 200 мкг белка отмечали повышение общего числа лейкоцитов по сравнению с контролем. Этот же показатель при увеличении дозы вводимого антигена-экстракта приблизился к контролю, но при этом значительно возросло число моноцитов. Количество тромбоцитов возрастало прямо пропорционально увеличению дозы инокулируемого лабораторным мышам антигена-экстракта. Также в зависимости от дозы вводимого антигена-экстракта наблюдали незначительное снижение числа эритроцитов, при этом регистрировали уменьшение показателя гемоглобина.

Изучение дозозависимости кариопатических последствий в костном мозге позволило также выявить митотические изменения.

В контрольной группе мышей при анализе мазков-отпечатков костного мозга были обнаружены только митотические фигуры на стадиях профаз и метафаз, поэтому подсчитать соотношение ПМ/АТ не представлялось возможным.

Исследования образцов костного мозга экспериментальных мышей, которым вводили антиген-экстракт *D. immitis*, показали, что гемопоэтическая ткань отвечала на увеличение дозы белка вводимого антигена возрастанием митотического индекса. При этом, максимальное количество митозов отмечали при дозе в 300 мкг белка/гол. Дальнейшее же увеличение дозы антигена-экстракта *D. immitis* на активность деления клеток не влияло.

В то же время, в качественном отношении большинство фигур деления отличалось от нормальной физиологической картины. Наиболее часто встречающейся формой патологии были многополюсный митоз, мосты в анафазе и, начиная с дозы 200 мкг, мы отмечали появление неравнополюсных ана-телофаз. Появление многополюсного митоза было прямо пропорционально увеличению дозы вводимого белка. Клетки семенников на увеличение дозы вводимого белка реагировали снижением активности (МИ, %), однако максимальное количество патологий мейоза от общего количества клеток мы регистрировали при дозе 300 мкг, тогда как этот же показатель от количества делящихся клеток был максимальным при самой высокой дозе – 1000 мкг белка. Большинство патологий не имело строго направленного характера и может быть вызвано неспецифическими факторами. Одной из таких патологий является многогрупповая метафаза, которую мы наблюдали как в контрольных, так и в опытных группах вне зависимости от дозы введенного антигена. Наиболее показательным является частота встречаемости метафазы с отставанием хромосом, которая прямо пропорциональна дозе введенного антигена-экстракта, но является неспецифичной патологией, так как она появляется в ответ на введение любого чужеродного агента или химического вещества. Одной из наиболее показательных форм патологий является агглютинация хромосом, которая свидетельствует о нарушении их структуры и подтверждает кариопатическое действие соматического белка антигена-экстракта *D. immitis*.

2.3.3. Кариопатическое действие на организм, клетки костного мозга и семенников лабораторных животных препаратов, применяемых против дирофиляриоза

2.3.3.1. Кариопатическое действие новомека

Гематологические показатели животных контрольных и опытных групп мышей, которым согласно инструкции, задавали разные дозы новомека, оставались в пределах физиологической нормы. Данные анализа частоты встречаемости клеток с кариопатическими изменениями в костном мозге у мышей контрольной группы и группы мышей, подвергнутых воздействию препарата новомек показали, что среди отдельных форм патологий в костном мозге преобладали многополюсный митоз, частота встречаемости которого возростала прямо пропорционально дозе введенного препарата. Метафазы с преждевременным расхождением хромосом встречались примерно на одном уровне. Также во всех экспериментальных группах мышей в незначительном количестве в клетках присутствовали анафазы с мостами. Неравнополюсные анафазы появились в костном мозге при дозе 400 мкг/кг и при дозе в 1000 мкг/кг их количество увеличилось на треть. Отставание хромосом в ана-телофазе

также появлялось в препаратах опытных групп и не коррелировало с дозой новомека.

Интересно отметить, что после введения препарата появились клетки с кариорексисом, причем частота их встречаемости напрямую зависела от дозы. Наиболее высокая доза новомека приводила к изменениям кариоморфологии и появлению лопатных ядер лимфоидного и миелоидного рядов. В семенниках лабораторных животных под воздействием препарата новомек мы также регистрировали изменения. Как мы указывали ранее, патологические митозы в нормальных тканях встречаются в 3% клеток и менее. В контрольной группе животных мы наблюдали высокую пролиферативную активность клеток семенников (МИ, %), при этом из наблюдаемых патологий деления ядра лидирующее место занимает метафаза с отставанием хромосомы и анафаза-телофаза с отставанием хромосом, группы хромосом в пределах допустимой физиологической нормы. В экспериментальных группах активность деления клеток (МИ, %) семенников при применении новомека снижается более чем в 2 раза, при этом мы видим, что увеличение дозы незначительно влияет на изменение показателя.

Процент патологий от общего количества клеток в течение всего опыта варьировал в пределах нормы. При этом увеличение процента патологий от количества делящихся клеток связано с увеличением дозы препарата. При сравнении соотношения фигур мы наблюдали преобладание метафаз и профаз над анафазами и телофазами, что свидетельствует о блокировке процесса деления клеток на ранних стадиях мейоза. В сравнении с интактной группой возрастает количество клеток с мостами в анафазе и телофазе. Данная патология прогрессирует с увеличением дозы ивермектина. Выявленная патология напрямую связана с повреждением хромосом и, как правило, приводит к генотипической разнородности дочерних клеток, а также нарушает течение завершающих стадий деления и задерживает цитокинез.

Значительно возрастает количество клеток с агглютинацией хромосом. Такая патология часто встречается в опухолевых клетках и при воздействии митотических ядов. Набухая, хромосомы утрачивают правильные очертания и, склеиваясь поверхностями, образуют неправильные комковатые массы. Расхождения хромосом не происходит, и клетки часто гибнут. В ходе эксперимента регистрировали такие нарушения как многополюсный мейоз, отставание хромосом, группы хромосом на всех стадиях деления клеток. Данные патологии связаны с повреждением хромосом и аппарата деления, что нарушает течение мейоза и задерживает цитокинез, а также может вызывать гибель клетки.

2.3.3.2. Кариопатическое действие эпримека

При оценке воздействия препарата эпримек сначала мы определяли гематологические показатели и изменения в лейкограмме у экспериментальных животных. В результате анализа установили, что гематологические показатели у лабораторных мышей под воздействием данного препарата оставались в пределах нормы. В то же время через 12 часов после воздействия препарата эпримек в лейкограмме мышей мы наблюдали значительное повышение юных

форм гранулоцитов и значительное снижение числа лимфоцитов по сравнению с контролем.

Кариопатические последствия, наблюдаемые в красном костном мозге мышей под воздействием препарата эпримек, показали, что помимо многополюсного митоза в большом количестве у делящихся клеток проявлялись неравнополюсная ана-телофаза, анафаза с отставанием отдельных хромосом и их групп и мосты в анафазе. Что касается исследования мазков-отпечатков из семенников мышей после введения им препарата эпримек, то анализ этих результатов показал значительные различия по сравнению с контрольной группой животных. В контрольной группе мышей мы наблюдаем высокую активность деления клеток (МИ, %), при этом профазы и метафазы незначительно преобладали над ана- и телофазами. Среди патологий мейоза в контрольной группе лидирующее положение занимает отставание хромосом и группы хромосом в метафазе, но при этом количество всех патологий остается в пределах допустимой физиологической нормы. В экспериментальной группе мышей активность деления клеток (МИ, %) семенников после воздействия эпримека снижается незначительно, но при этом в семь раз возрастает процент патологий от количества делящихся клеток и нарушается баланс соотношения профаз и метафаз к ана- и телофазам. Данный факт говорит о блокировке нормального деления еще на ранней стадии и одновременном производстве патологических клеток.

В сравнении с интактной группой появляются такие патологии мейоза, как агглютинация хромосом, образование мостов в анафазе, преждевременное расхождение хромосом в профазе и метафазе, отставание хромосом и группы хромосом на всех стадиях деления. Выявленные патологии связаны с повреждением хромосом и аппарата деления клетки, что нарушает течение мейоза и задерживает цитокинез. В конечном итоге это приведет к гибели клетки. В ходе эксперимента мы отмечали значительное количество клеток с токсической вакуолизацией цитоплазмы и появление клеток с микроядрами.

2.3.3.3. Кариопатическое действие диронета

В первую очередь, воздействие диронета на организм лабораторных животных изучали по изменению гематологических показателей лабораторных животных. Данные этого анализа свидетельствуют о том, что препарат не оказывал влияния на эти показатели, они оставались в пределах физиологической нормы. Что касается анализа лейкограммы, то у мышей, получивших диронет, отмечали статистически достоверное увеличение числа юных форм нейтрофилов по сравнению с контролем. Весьма показателен рост количества миелоцитов в лейкограмме экспериментальной группы. Результаты исследования красного костного мозга лабораторных животных продемонстрировали отрицательное влияние препарата диронет на гемопоэтическую ткань. В рекомендуемой по инструкции дозировке (1 таблетка на 10 кг массы животного) препарат диронет у половины животных вызвал кариорексис, а также образование мостов в ана-телофазе. У всех мышей опытной группы мы наблюдали трехполюсную метафазу, которая по сравнению с контролем увеличилась в 30 раз. Данная патология

свидетельствует о нарушении образования митотического веретена, которое в норме является биполярной структурой, состоящей из микротрубочек. Митотическое веретено организуют центриоли, входящие в состав клеточного центра. По нашему мнению, применение препарата диронет вызвало образование дополнительной центриоли еще на стадии профазы, которое проявилось развитием явной патологии в метафазе. В отношении сперматогенного эпителия диронет также показал негативное влияние. После воздействия препарата диронет в семенниках лабораторных мышей активность деления клеток снизилась при значительном повышении (более чем в 4 раза) уровня патологий мейоза $13,60 \pm 2,24\%$ по сравнению с показателем контроля $3,10 \pm 1,70\%$. При этом соотношение фаз сдвинулось в сторону ана-телофаз. Произошло достоверное увеличение количества таких патологий, как отставание хромосом в метафазе ($1,89 \pm 0,99\%$ и $6,47 \pm 2,24\%$) и агглютинация хромосом (0 и $4,25 \pm 2,11\%$).

Таким образом, мы можем заключить, что препарат диронет в рекомендуемой дозе после однократного введения угнетает репродуктивную функцию сперматогенного эпителия, что может отрицательно сказаться на качестве потомства.

2.3.3.4. Кариопатическое действие мильбемакса

Изменение показателей крови группы подопытных мышей после однократного введения препарата мильбемакс, по отношению к гематологическим показателям контрольной группы, не регистрировали. Также при сравнении с действием других исследуемых антигельминтиков мы отметили наименьшее отрицательное действие мильбемакса на картину крови мышей. Изучение препаратов красного костного мозга и семенников мышей после введения препарата мильбемакс в терапевтической дозировке позволило установить негативные изменения в обоих органах. Под действием данного препарата произошло повышение митотического индекса более чем в четыре раза по сравнению с контрольными данными ($0,15 \pm 0,05\%$ и $0,66 \pm 0,04\%$), при этом почти у половины делящихся клеток отмечали такую патологию, как многополюсный митоз.

Единично мы обнаруживали также преждевременное расхождение хромосом в метафазе, неравнополюсные анафазы, отставание хромосом в ана-телофазе и нарушения нуклеоморфологии – расплавление ядра, гомогенизация и вакуолизация ядра в клетках миелоидного ряда. Как и диронет, мильбемакс снижал митотическую активность клеток сперматогенного эпителия лабораторных животных. При этом количество патологии делящихся клеток возросло в три раза по сравнению с контролем ($9,24 \pm 7,29\%$ и $3,10 \pm 1,70\%$). Угнетение мейоза происходило на всех стадиях процесса, о чем свидетельствует соотношение профаз-метафаз к ана-телофазам. Нарушение процесса деления проявлялось, прежде всего, в патологии микротрубочек веретена деления, которое проявилось отставанием хромосом, в метафазах и в анафазах. Помимо этого, происходило нарушение структуры самих хромосом, проявляющееся в их агглютинации.

Также единично в семенниках мы обнаруживали многополюсный митоз, формирование мостов в анафазе, многогрупповой митоз. Среди интерфазных были выявлены клетки с микроядром.

2.3.3.5.Кариопатическое действие эндогарда на лабораторных животных

Во время проведения эксперимента общее состояние животных оставалось удовлетворительным. Результаты гематологического анализа подтверждают увеличение абсолютного содержания гранулоцитов (нейтрофилов) в крови подопытных животных. При анализе состояния эритроцитов мы выявили незначительное увеличение МНС – показатель насыщенности эритроцита гемоглобином, что происходит в результате увеличения его объема. Одним из преимуществ исследования крови на автоматическом гемоанализаторе является возможность изучения состояния тромбоцитов, что недоступно обычными рутинными методами. После применения препарата эндогард мы установили увеличение количества тромбоцитов в 2 раза выше нормы, что может быть следствием как активации мегакариобластов красного костного мозга, так и патологическими процессами в селезенке, печени или легких, нарушающими активность макрофагов и как следствие элиминацию старых тромбоцитов из кровяного русла. Для установления конкретной причины тромбоцитоза необходимо провести цитологическое исследование костного мозга и гистологический анализ указанных органов.

В ходе проведенного исследования мы установили следующие закономерности. Через 12 часов после применения эндогарда произошло увеличение количества лейкоцитов почти в 2 раза по сравнению с контролем, что вышло за пределы показателей нормы. Исследования показали, что среди разных субпопуляций лейкоцитов наиболее выраженную реакцию проявили нейтрофилы, среди которых мы обнаруживали клетки с разной степенью созревания ядра, при этом уровень юных нейтрофилов превысил показатели нормы в 2 раза ($1,00 \pm 0,10\%$ и $2,40 \pm 0,64\%$). Интересным фактом является появление в крови опытной группы мышей миелоцитов ($0,60 \pm 0,23\%$ и $4,80 \pm 2,56\%$), количество которых по сравнению с контрольной группой выросло в 8 раз. Зафиксированные нами изменения свидетельствуют о значительной активации миелоидного ростка кроветворения.

В состоянии костного мозга фиксировали изменения, проявляющиеся повышением митотического индекса. При повышении митотического индекса в 8,3 раза по сравнению с контролем около половины делящихся клеток имели патологии деления, подавляющее большинство которых составил многополюсный митоз (0 и $34,30 \pm 10,59\%$). Соотношение фигур деления демонстрировало сдвиг в сторону ана-телофаз, что говорит о том, что клетки на предыдущих стадиях деления элиминировались из гемопоэтической ткани. Помимо этого, мы находили мосты в анафазе, неравнополюсные анафазы, отставание хромосом в анафазе, а также картину кариорексиса.

Активность деления клеток семенников у мышей опытной группы по сравнению с контролем была снижена и МИ составил $15,70 \pm 1,52\%$, в то время как в контрольной группе он оказался на уровне $19,54 \pm 1,31\%$.

Таким образом, мы регистрировали подавление активности мейоза в семенниках экспериментальных животных под действием компонентов препарата эндогард. Количество клеток с нарушениями мейоза по отношению к делящимся клеткам (%) в контроле составило $3,10 \pm 1,70\%$, что не выходит за рамки физиологической нормы, тогда как в клетках экспериментальных животных, получивших препарат эндогард, этот показатель оказался значительно выше и достиг $11,79 \pm 2,02\%$. Следовательно, уровень патологических делений клеток под действием изучаемого препарата возрос практически в 4 раза.

Соотношение фигур деления профазы-метафазы/анафазы-телофазы (ПМ/АТ) в контрольной и опытной группе оказались примерно на одном уровне: $7,34 \pm 1,32\%$ и $6,24 \pm 1,57\%$, соответственно. Это свидетельствует о том, что угнетение процесса мейоза происходит на всех стадиях без блокировки какого-то определенного этапа.

Среди патологий деления в контрольной группе мы регистрировали отставание отдельных хромосом и групп хромосом в метафазе, отставание хромосом в ана-телофазе. Единично отмечали многополюсный митоз, анафазу с хромосомным мостом, агглютинацию хромосом.

В опытной группе преобладало отставание хромосом в метафазе, агглютинация хромосом, хромосомные мосты в анафазе, отставание хромосом в анафазе и трехполюсные анафазы. Единично встречались многогрупповые метафазы и преждевременное расхождение хроматид в профазе.

Таким образом, наиболее часто встречающейся патологией как в контроле, так и в опыте оказалось отставание хромосом или их групп в метафазе и анафазе, которое ранее регистрировали в делящихся клетках под воздействием различных биологических и химических агентов. Сформированные в процессе такого мейоза дочерние клетки содержат микроядра или ядрышки и являются анеуплоидными.

Под действием эндогарда в несколько раз увеличилось количество клеток с агглютинацией хромосом. Данная патология часто встречается в опухолевых клетках и под воздействием митотических ядов. Хромосомы утрачивают правильные очертания и, склеиваясь поверхностями, формируют комковатые массы, что, несомненно, приводит к гибели клетки.

Склеивание части хромосом приводит к образованию хромосомных мостов в анафазе, что мы и наблюдали в опытной и контрольной группах, причем процентное соотношение уровня данной патологии находилось примерно на одном уровне.

Так, наибольшие изменения митотического индекса в костном мозге мышей регистрировали под действием эндогарда ($1,24 \pm 0,36\%$) и диронета ($1,08 \pm 0,29\%$), тогда как в семенниках этот показатель значительно снизился по сравнению со значением контрольной группы ($19,54 \pm 1,31\%$) после воздействия препарата новомек ($9,44 \pm 2,35\%$).

Что касается частоты патологий митоза от количества делящихся клеток в костном мозге мышей, то этот показатель был больше под действием препарата диронет ($55,07 \pm 10,28\%$), затем эндогард ($49,44 \pm 12,55\%$) и мильбемакс ($45,23 \pm 12,38\%$). Аналогичный показатель в клетках семенников

лабораторных животных получил наибольшее значение после воздействия диронета ($13,60 \pm 2,24\%$), затем следует эпримек ($12,86 \pm 4,49\%$) и эндогард ($11,79 \pm 2,02\%$).

2.4. Терапия и профилактика дирофиляриоза служебных собак в Пермском крае

Сохранение и сбережение собак – один из наиважнейших вопросов служебной кинологии.

Лечение дирофиляриоза должно быть комплексным, и в зависимости от вида паразитирующей нематоды, интенсивности инвазии, тяжести течения заболевания должен подбираться препарат специфической терапии, направленный на устранение этиологического фактора. Также необходимо учитывать возможные ассоциации заболеваний в рамках одного организма.

Нами в силу доступности и экономической приемлемости в промышленных условиях опробованы макроциклические лактоны на основе ивермектина – ивомек, новомек и эпримек. Органическим растворителем для большинства авермектинов служит пропиленгликоль, являющийся пищевым и фармацевтическим консервантом. В ивермек дополнительно введен токоферол, снижающий его токсичность.

Также мы применяли для лечения служебных собак другой авермектин – эпримек, который в качестве действующего вещества содержит эприномектин, а в качестве растворителя бензиловый спирт.

Как показал опыт, лечение служебных собак с диагнозом дирофиляриоз должно осуществляться строго в условиях стационара, при этом движение животных ограничивают, моцион снижают до минимума, кормление осуществляют режимно со строгим соблюдением низкобелковой легкоусвояемой диеты, а контроль приема препаратов должны осуществлять ветеринарные специалисты с учетом изменения общего состояния, физиологических показателей, а также биохимических и гематологических показателей крови, при этом изменение числа микрофилярий в крови до и после применения авермектинов должно регистрироваться, поскольку этот момент имеет важное значение и говорит об эффективности выбранной терапии.

Необходимым условием лечения опасного гельминтоза было применение антикоагулянтов, которое начиналось за 1,5-2 недели до применения химиотерапии, продолжалось на протяжении всего лечения и некоторое время восстановительного периода, что требовало практически круглосуточного наблюдения за животными, так как факт ульцерогенного эффекта аспирина и других нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС) на организм собаки общеизвестен. Ситуация осложнялась включением в схему преднизолона, который максимально снижал риск развития аллергического шока, но совместно с НПВС увеличивал вероятность развития желудочно-кишечного кровотечения.

Применение макроциклических лактонов осуществлялось на фоне инфузиотерапии, с применением гипоксантов, гепатопротекторов, средств, улучшающих микроциркуляцию крови, аналептиков, противоишемических и общепитательных препаратов.

Наличие у дирофилярий бактерий – эндосимбионтов делает обязательным применение антибактериальных средств. Наибольшую чувствительность *Wolbachia pipientis*, по данным отечественных и зарубежных ученых, проявила к антибиотикам тетрациклинового ряда, что и определило включение доксициклина в схему лечения.

Нами разработана схема – шаблон, которая на протяжении нескольких лет применялась для лечения служебных собак с небольшими адаптивными изменениями по отношению к каждому животному. Акцентируем внимание на том, что на протяжении всего периода лечения требуется осуществлять контроль биохимических и клинических показателей крови животного, а также контролировать степень микрофиляремии проведением исследования крови методом концентрации.

Данная схема лечения была применена для микрофилярицидной терапии 28 собак с диагнозом дирофиляриоз, из них три собаки были поражены *D. immitis* и 25 – *D. repens*. Эффективность терапии составила 100%. При этом все животные с кожной формой достаточно легко перенесли терапию и в короткие сроки приступили к выполнению задач служебной деятельности, а собаки с сердечным дирофиляриозом даже после продолжительного периода восстановления - не смогли вернуться к нормальному режиму работы, что проявлялось непереносимостью физических нагрузок, быстрой утомляемостью. Эти служебные собаки были подвергнуты выбраковке.

Как уже отмечалось выше, в 2015г. в питомнике ЦКС ГУ МВД РФ по Пермскому краю собак с микрофиляремией обнаружено не было, что можно объяснить использованием при проведении профилактических дегельминтизаций препарата инспектор. В состав этого антигельминтного средства входит моксидектин 2,5% и фипронил 10%. В то же время использование в других кинологовических подразделениях препарата барс и барс форте на основе перметрина и фипронила не дали положительных результатов. Мы не проводили опыты по изучению карриопатического воздействия препарата инспектор на клетки лабораторных животных, так как его применение в рамках служебного собаководства в силу высокой стоимости скорее исключение из правил, чем норма, но мы не можем не отметить его высокую эффективность против микрофилярий. Ветеринарные службы питомников ФСИН в большинстве случаев для проведения плановых дегельминтизаций используют препарат диронет, что снизило, но не исключило наличие микрофилярий в крови животных. Так в 2016 г. из 56 обследуемых служебных собак из этих питомников, несмотря на своевременное проведение профилактических мероприятий, у 2 особей выявлена микрофиляремия. Таким образом для успешной профилактики микрофиляремии мы рекомендуем использовать препараты на основе макроциклических лактонов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы мы установили стойкий очаг дирофиляриоза среди служебных собак в Пермском крае. Начиная с 2010 г. инвазию стали регистрировать в различных подразделениях, с наивысшим пиком в 2013-2014 гг., где экстенсивность инвазии (ЭИ) *D. repens* составила – 16,8%,

при этом поражение сердечной формой не регистрировали, а в 2016 г. ЭИ как *D. repens*, так *D. immitis* была в пределах 1,7%.

Чувствительность иммуноферментной реакции (ИФР) с соматическим антигеном-экстрактом из половозрелых *D. immitis* составила 82,14%, специфичность – 75%. В пробах сывороток собак с высокой степенью микрофиляремии (4 тыс. личинок/мл крови) в ИФР были получены отрицательные результаты, что свидетельствует об угнетении работы всех звеньев иммунной системы животных, ответственных за выработку специфических антител. При этом из 172 собак, у которых гельминтологическими методами микрофилярий в крови не выявляли, в ИФР показали следующий результат: 129 (75%) реагировали отрицательно, 8 (4%) проб сывороток – положительно, а 35 (20%) проб показали сомнительный результат. Положительный результат в ИФР среди проб крови собак, свободных от микрофилярий, может свидетельствовать о поражении диروفилариями (скрытая форма). Проведение иммунодиагностических тестов, в частности ИФР, рекомендовано применять для выявления скрытых форм диروفилариоза.

Для дифференциальной диагностики возбудителей диروفилариоза до вида возбудителя в ИФР необходимо использовать очищенные белковые антигены, а по возможности использовать и другие информативные тесты, как, например, полимеразная цепная реакция, масс-спектрометрия.

После воздействия на лабораторных мышей антигеном-экстрактом из половозрелых *D. immitis* в дозе 100 мкг/гол. клинически важных изменений гематологических показателей мы не регистрировали. Более значительные изменения показателей отметили в популяции лейкоцитов, а именно через 4 часа наблюдали увеличение числа нейтрофилов и моноцитов, достигших наивысшего значения через 24 часа. Через 72 часа эти показатели незначительно отличались от результатов контрольной группы. При этом мы отмечаем дозозависимый эффект.

Так, при введении 300 мкг белка/гол. соматического антигена-экстракта максимально возрастало количество моноцитов ($6,20 \pm 2,08\%$) и тромбоцитов ($999,25 \pm 107,75\%$) в крови лабораторных животных. С повышением дозы вводимого антигена-экстракта *D. immitis* мы наблюдали возрастающее количество морфологических изменений в клетках крови мышей, характерных для токсического поражения – это вакуолизация цитоплазмы и ядер, а также регистрировали патологическую зернистость, лопастные ядра и клетки с микроядрышками.

Экспериментальными исследованиями установили, что соматический антиген-экстракт из половозрелых *D. immitis* вызывает повышение митотического индекса в красном костном мозге и увеличение количества нарушений деления клеток вне зависимости от дозы вводимого белка. Максимальное значение патологий составило $46,34 \pm 6,95\%$ при дозе 200 мкг/гол. В семенниках лабораторных животных митотический индекс в зависимости от дозы прямо пропорционально уменьшался, а количество патологий делящихся клеток достигло $22,40 \pm 7,67\%$ при дозе 1000 мкг/гол. через 12 часов после введения антигена-экстракта.

Изучение кариопатического действия препаратов новомек, эпримек, диронет, мильбемакс и эндогард в терапевтической дозе показало, что наименьшую митотическую активность гемопоэтических клеток оказал мильбемакс (МИ $0,66 \pm 0,04\%$ при $0,15 \pm 0,05\%$ в контроле), а наибольшую пролиферацию клеток вызвали эндогард и диронет ($1,24 \pm 0,36\%$ и $1,08 \pm 0,29\%$), при этом наибольшее количество патологий деления клеток костного мозга спровоцировало воздействие препарата диронет ($55,07 \pm 10,28\%$ при 0 в контроле).

В семенниках угнетение мейоза сперматогенного эпителия вызвал новомек (МИ $9,44 \pm 2,35\%$ при $19,54 \pm 1,31\%$ в контроле), наибольшее количество патологий деления вызвало влияние антигельминтика диронет ($13,6 \pm 2,24\%$ при $3,10 \pm 1,70\%$ в контроле).

Таким образом, наибольший кариопатический эффект на клетки лабораторных мышей установлен для препарата диронет.

Нами апробирована схема микрофилярицидной терапии дирофиляриоза служебных собак с применением препаратов на основе макроциклических лактонов – эпримек и новомек, однако последний не рекомендуется использовать для племенных животных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

❖ Для повышения качества профилактических мероприятий по предотвращению распространения дирофиляриоза среди служебных собак целесообразно проведение комплексного обследования животных в рамках плановой ежегодной диспансеризации поголовья, позволяющей выявить стадию, тяжесть заболевания, обнаружить сопутствующие патологии.

❖ Включить в план диспансеризации микроскопическое исследование крови методом концентрации с определением вида и количества микрофилярий, с обязательным проведением иммунодиагностических тестов для отрицательных проб с целью выявления скрытых форм дирофиляриоза.

❖ Проведение плановой ежемесячной химиопрофилактики с применением комбинированных препаратов, содержащих макроциклические лактоны и инсектициды, в период активности переносчиков под строгим контролем состояния здоровья служебных собак.

❖ Рекомендуем применять эприномектин для лечения микрофиляриемии.

❖ Применение макроциклических лактонов для племенных животных не рекомендовано.

❖ Данные материалы рекомендованы для ознакомления и практического применения в работе ветеринарными врачами, специалистами-кинологами, медицинскими работниками и биологами.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Согрина А.В. Паразитарные заболевания служебных собак города Перми/ Согрина А.В. Сивкова Т.Н.// Мат. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». –2007. – Вып. 8. – С. 332-335.

2. Согринa А.В. Паразитарные заболевания собак и кошек г. Перми/ Согринa А.В.// Мат. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – 2008. – Вып. 9. – С. 454-455.
3. Согринa А.В. Дирофиляриоз служебных собак в Пермском крае/ Согринa А.В.// Систематика и экология паразитов. – 2014. – С. 294-295.
4. **Согринa А.В. Паразитарные зоонозы служебных собак города Перми/ Согринa А.В. Сивкова Т.Н.// Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – том 16. – № 5 (1). – С. 518-520.**
5. Sogrina A. Pathology of testes cells in white mice after impact of Novomek / Sogrina A., Berezhko V., Sivkova T., Napisanova L., Prohorova T.//VI International Scientific Agricultural Symposium “AGROSYM 2015”. – Jahorina. – 2015. – P. 1788-1790.
6. Согринa А.В. Паразитарные болезни домашних плотоядных города Перми в 2014 году/ Согринa А.В. Сивкова Т.Н.// Мат. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – 2015. – Вып. 16. – С. 405-407.
7. Согринa А.В. Патологии мейоза клеток семенников белых мышей под воздействием соматического антигена *Dirofilaria immitis*/ Согринa А.В., Бережко В.К., Сивкова Т.Н., Написанова Л.А.// Сб. ст. по материалам XXVII междунар. науч.-практ. конф «Естественные и математические науки в современном мире». – Новосибирск: Изд. «СибАК». – 2015. – № 2 (26). – С. 176-184.
8. Согринa А.В. Изменение гематологических показателей у белых мышей под воздействием препарата Эндогард®/ Согринa А.В.// Мат. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» – М. – 2016. – Вып. 16. – С. 441-446.
9. **Согринa А.В. Проблемы организации борьбы с дирофиляриозом в Российской Федерации/ Доронин-Доргелинский Е.А., Согринa А.В.// Пермский аграрный вестник. – Пермь. – 2016. – № 3. – С. 129-133.**
10. **Согринa А.В. Анализ причин распространения паразитарных зоонозов среди населения Пермского края/ Доронин-Доргелинский Е.А., Сивкова Т.Н., Согринa А.В.// Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – М. – 2016. – № 3. – С. 26-29.**
11. Согринa А.В. Ситуация по дирофиляриозу служебных и охотничьих собак в Пермском крае за 2015 год / Согринa А.В. //Фауна и экология паразитов, Российская академия наук. – том XLIX – М. – 2016. – С. 169-170.