

УДК 619:616.995.1

<https://doi.org/10.31016/978-5-6050437-8-2.2024.25.169-175>

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРЯМЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ДИРОФИЛЯРИОЗОВ

Киосова Ю. В.¹,

биолог клиники инфекционных и паразитарных болезней

Нагорный С. А.¹,кандидат биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории санитарно-паразитологического мониторинга,
медицинской паразитологии и иммунологии**Ермакова Л. А.**¹,кандидат медицинских наук, заведующая клиникой
инфекционных и паразитарных болезней**Теличева В. О.**¹,

биолог клиники инфекционных и паразитарных болезней

Аннотация

Дирофиляриозы — относительно новая медицинская проблема, непосредственно связанная с изменением природно-климатических и социальных условий. Несмотря на значительное повышение и качество мероприятий по дегельминтизации собак — наиболее эпидемиологически значимого источника заражения дирофиляриями, в последние десятилетия отмечается рост пораженности данными нематодами дефинитивных хозяев на территории Европы, как в высокоэндемичных районах, где исторически отмечается их стабильная циркуляция, так и экспансия дирофилярий на новые территории. За 2023 год собрана венозная кровь 233 собак из приютов для бездомных животных города Ростова-на-Дону и Ростовской области. В результате проведенных исследований из 233 образцов крови собак методом ларвоскопии личинки дирофилярий обнаружены в 53 образцах с интенсивностью инвазии от одной до ста личинок в 0,2 мл крови, экстенсивность инвазии — 22,75%. Методом ПЦР ДНК дирофилярий обнаружены в 60 образцах. Пораженность собак составила 25,75%, из которых *Dirofilaria repens* — 21,67%, *D. immitis* — 41,67%, микст-инвазия составила 36,67%. Анализ полученных результатов в четырехпольной таблице

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора (344000, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, д. 119)

сопряженности показал, что чувствительность метода ПЦР составила 90,57%, метода микроскопии – 81,36%. Специфичность первого метода составила 93,33%, второго – 97,13%. Разрабатываемая нами тест система позволяет в одном исследовании определить наличие двух видов дирофилярий и может быть внедрена в работу исследовательских лабораторий.

Ключевые слова: беспризорные собаки, дирофиляриоз, *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis*, ПЦР-РВ

COMPARATIVE ANALYSIS OF DIRECT DIAGNOSTIC METHODS FOR DIROFILARIASIS

Kiosova Yu. V.¹,

Biologist of the Infectious and Parasitic Disease Clinic

Nagorniy S. A.¹,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher
of the Laboratory of Sanitary and Parasitological Monitoring,
Medical Parasitology and Immunology

Ermakova L. A.¹,

Candidate of Medical Sciences,
Head of the Infectious and Parasitic Disease Clinic

Telicheva V. O.¹,

Biologist of the Infectious and Parasitic Disease Clinic

Abstract

Dirofilariasis is a relatively new medical problem directly related to changes in natural, climatic, and social conditions. Despite significant improvements and quality of deworming measures for dogs, the most epidemiologically significant source of *Dirofilaria* infection, there has been an increase in recent decades in the incidence of these nematodes in definitive hosts in Europe, both in highly endemic areas where their constant circulation is noted historically and *Dirofilaria* expansion into new areas. For 2023, venous blood was collected from 233 dogs from animal shelters in Rostov-on-Don and the Rostov Region. The results of the studies showed that *Dirofilaria* larvae were found in 53 out of 233 blood samples of the dogs by larvoscopy with an invasion intensity of one to one hundred larvae in 0.2 mL of blood, and the prevalence of 22.75%. *Dirofilaria* DNA was detected in 60 samples

¹ Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology (119, Gazetnyy Alley, Rostov-on-Don, 344000, Russia)

by PCR. The prevalence in the dogs was 25.75% of which *Dirofilaria repens* was 21.67%, *D. immitis* was 41.67%, and mixed invasion was 36.67%. An analysis of the results in the confusion matrix showed that the PCR sensitivity was 90.57%, and the microscopy sensitivity was 81.36%. The specificity of the first method was 93.33%, and the second method, 97.13%. The test system we are developing allows us to determine the presence of two *Dirofilaria* species in one study and can be implemented in research laboratories' work.

Keywords: stray dogs, dirofilariasis, *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis*, real time PCR

Введение. Дирофиляриозы относительно новая медицинская проблема, непосредственно связанная с изменением природно-климатических и социальных условий. Несмотря на значительное повышение и качество мероприятий по дегельминтизации собак — наиболее эпидемиологически значимого источника заражения дирофиляриями, в последние десятилетия отмечается рост пораженности данными нематодами дефинитивных хозяев на территории Европы, как в высокоэндемичных районах, где исторически отмечается их стабильная циркуляция, так и экспансия дирофилярий на новые территории [2]. Изменение климата, влияющее на комаров-переносчиков, и миграция домашних животных также способствовали расширению ареала дирофиляриозов. Однако, по мнению Simon et al., основным фактором является значительное количество зараженных дирофиляриями собак, не подвергающихся обследованию (безнадзорных и сельских) [3]. Многие инфицированные собаки остаются без внимания ветеринарных организаций из-за субклинического течения заболевания, отсутствия надежных диагностических инструментов, а также низкой осведомленности о дирофиляриозах специалистов и хозяев животных в неэндемичных районах.

Методы прямой диагностики остаются «золотым стандартом», но требуют высокой квалификации исследователей. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) также является методом прямой диагностики, позволяющий обнаруживать ДНК паразитарных патогенов в различных биологических субстратах.

Цель — сравнить результаты исследования крови безнадзорных собак на наличие личинок дирофилярий с помощью методов ларвоскопии и ПЦР диагностики.

Материалы и методы. За 2023 год собрана венозная кровь 233 собак из приютов для бездомных животных города Ростова-на-Дону и Ростовской области.

Исследование крови собак на дирофиляриозы проводили двумя методами: морфологическим (концентрационным) методом и методом ПЦР-РВ. Для морфологического исследования кровь в объеме 200 мкл растворяли в 9 мл 3% уксусной кислоты для гемолиза эритроцитов, выдерживали несколько минут при комнатной температуре, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 7 мин, осадок помещали на предметное стекло, высушивали на воздухе, фиксировали 96%-ным этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Препараты исследовали при малом увеличении микроскопа 10х, видовую идентификацию микрофилярий проводили под иммерсионной системой. Идентифицировали до вида на основании особенностей анатомического строения и размера личинок.

ПЦР проводили с помощью разработанных нами праймеров к *D. repens* и *D. immitis* в соответствии с протоколами выделения и амплификации ДНК [1]. Кровь собак предварительно обрабатывали гемолитиком. В одноразовые пробирки типа эппендорф объемом 1,5 мл добавляли по 1мл реактива, маркировали их. Затем в пробирки вносили по 0,25 мл исследуемой цельной крови и перемешивали на вортексе. Оставляли пробирки при комнатной температуре на 5 минут, еще раз перемешивали и оставляли еще на 5 минут. Центрифугировали на микроцентрифуге при 8 тыс. об/мин в течение 2 минут. Надосадочную жидкость отбирали, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Обработку гемолитиком повторяли дважды. Далее выделение ДНК проводили с помощью набора М-Сорб-кровь (СИНТОЛ) по усовершенствованному протоколу: к 500 мкл лизирующего раствора добавляли протеиназу К (концентрация 10 г/мл, 7 мкл на пробу) и дитиотрейтол (1 М, 5 мкл на пробу). Лизис биологического материала проводили в течение 2 часов при температуре +56 °С в условиях периодического перемешивания содержимого пробирок, далее выделение проводили согласно инструкции к набору М-Сорб-кровь (СИНТОЛ).

Приготовление ПЦР смеси для проведения реакции осуществляли с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVAGreen (СИНТОЛ). Инкубационную смесь готовили конечным объемом 25 мкл. Расчет реактивов смеси на 1 пробу: 10-кратный ПЦР буфер с EVAGreen – 2,5 мкл; 25 мМMgCl₂ – 2,5 мкл; 2,5 мМdNTP – 2,5 мкл; Праймер F (1 О. Е.) – 1 мкл; Праймер R (1 О. Е.) – 1 мкл; ДНК-Тaq-полимераза (5 Ед/мкл) – 0,3 мкл, деионизованная вода – 12,2 мкл.

Готовили две реакционные смеси, отдельно для праймеров к *D. repens*: (F2690DR) 5'-AAGTGTGATGGTCAACCTGAA-3' и (R2812DR) 5'-GTAGAACGCATATTCTGAGT-3'. Отдельно к праймерам *D. immitis* (F2690DI) 5'-GAGTGTAGAGGGTCAGCCTGAG-3' и (R2812DI) 5'-GTAGAACGTATATTCTGAAC-3'.

Режимы амплификации: начальная денатурация при температуре 95°C в течение 5 мин., затем 45 циклов, включающие 95°C – 10 сек., отжиг при 60°C – 10 сек., синтез при 72°C – 30 сек. В качестве положительного контроля использовали морфологически подтвержденные гомогенаты нематод, содержащие ДНК *D. repens* и *D. immitis*, в качестве отрицательного – деионизованная вода.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований из 233 образцов крови собак методом ларвоскопии личинки дирофилярий обнаружены в 53 образцах с интенсивностью инвазии от одной до ста личинок в 0,2 мл крови, экстенсивность инвазии – 22,75%.

Методом ПЦР ДНК дирофилярий обнаружены в 60 образцах. Пораженность собак составила 25,75%, из которых *D. repens* – 21,67%, *D. immitis* – 41,67%, микст-инвазия составила 36,67% (таблица).

Таблица

Сравнительный анализ положительных результатов крови собак на дирофиляриозы

Положительные пробы	Микроскопия	53
	ПЦР	60
<i>D. repens</i>	Микроскопия	24
	ПЦР	13
<i>D. immitis</i>	Микроскопия	10
	ПЦР	25
<i>D. repens</i> + <i>D. immitis</i>	Микроскопия	19
	ПЦР	22

В 48 пробах результаты подтверждены двумя методами. В пяти пробах при микроскопии обнаружены личинки от 1 до 10 в 0,2 мл крови, тогда как метод ПЦР дал отрицательный результат. Следует отметить, что исследование более половины образцов крови собак методом ПЦР удавалось провести от несколько месяцев до года после проведения ларвоскопии, а не параллельно. В 11 образцах результаты

микроскопии были отрицательными, а ПЦР выявил ДНК дирофиляриий. Часть положительных проб, полученных методом ПЦР, была повторно исследована путем микроскопии. В нескольких пробах при повторном исследовании методом ларвоскопии были обнаружены личинки дирофиляриий.

Анализ полученных результатов в четырехпольной таблице сопряженности показал, что чувствительность метода ПЦР составила 90,57%, метода микроскопии – 81,36%. Специфичность первого метода составила 93,33%, второго – 97,13%.

Заключение. Результаты исследования показали, что экстенсивность заражения дирофиляриями безнадзорных собак города Ростова-на-Дону составила 25,75%. Собаки заражены двумя видами: *D. repens* – 21,67%, *D. immitis* – 41,67%, а также микст-инвазией – 36,67%. Метод ПЦР позволил выявить большее количество зараженных собак. Повторная ларвоскопия образцов крови, в которых методом ПЦР обнаружена ДНК дирофиляриий, в некоторых случаях позволила обнаружить личинки. Разрабатываемая нами тест система позволяет в одном исследовании определить наличие двух видов дирофиляриий и может быть внедрена в работу исследовательских лабораторий.

Список источников

1. Патент на изобретение 2773944 С1, 14.06.2022. Заявка № 2021135820 от 06.12.2021. Способ выявления видов возбудителей дирофиляриоза *Dirofilaria repens* и *Dirofilaria immitis* с помощью ПЦР в режиме реального времени / И. В. Корниенко, С. А. Нагорный, Л. А. Ермакова и др.: заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии». 15 с.
2. Capelli G., Genchi C., Baneth G., Bourdeau P., Cardoso L., Danesi P., Fuehrer H-P., Giannelli A., Monica Ionica A., Maia C., Modry D., Montarsi F., Krucken J., Papadopoulos E., Petric D., Pfeffer M., Savic S., Otranto D., Poppert S., Silaghi C. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe // Parasites & vectors. 2018; 11(1): 1-21.
3. Simón F., Siles-Lucas M., Morchon R., Gonzalez-Miguel J., Mellado I., Carreton E., Montoya-Alonso J. A. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic // Clinical microbiology reviews. 2012; 25(3): 507-544.

References

1. Patent for Invention 2773944 C1, 14/06/2022. Application No. 2021135820 dated 06/12/2021. A method for detecting species of the causative agents of dirofilariasis *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* using real-time PCR. I. V. Kornienko, S. A. Nagorny, L. A. Ermakova, et al.: Applicant, the Federal Budgetary Institution of Science "Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology". 15 p. (In Russ.)
2. Capelli G., Genchi C., Baneth G., Bourdeau P., Cardoso L., Danesi P., Fuehrer H-P., Giannelli A., Monica Ionica A., Maia C., Modry D., Montarsi F., Krucken J., Papadopoulos E., Petric D., Pfeffer M., Savic S., Otranto D., Poppert S., Silaghi C. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites & vectors*. 2018; 11(1): 1-21.
3. Simón F., Siles-Lucas M., Morchon R., Gonzalez-Miguel J., Mellado I., Carreton E., Montoya-Alonso J. A. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical microbiology reviews*. 2012; 25(3): 507-544.