

**ПОШИРЕННЯ ДИРОФІЛЯРІОЗУ СОБАК ПІВДЕННО-СХІДНОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ
ТА ЕФЕКТИВНІСТЬ РІД В ЙОГО ДІАГНОСТИЦІ**

Келеберда М.І., Олешко А.Ю., Кузнецов Є.П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Фурда І.В.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

За останні роки у великих містах та населених пунктах України спостерігається постійне збільшення чисельності собак і котів, що веде до погіршення епізоотичної та епідеміологічної ситуації щодо небезпечних паразитозів тварин і людей. За статистичними даними серед всіх захворювань тварин та людей інвазійні хвороби займають четверте місце, а дирофіляріоз є найбільш розповсюдженим та небезпечним антропозоонозом. В останні десятиліття спостерігається тенденція до зростання числа випадків на це захворювання, як у людей так й у тварин, що можна пов'язати з відносним потеплінням клімату в світі, яке веде до збільшення кількості комах – переносників філяріатозних інвазій. Високий рівень ураженості собак дирофіляріями та велика кількість переносників створюють явну загрозу та потенційні можливості для зростання інвазування дирофіляріями в багатьох регіонах світу, в тому числі й Україні. У зв'язку з чим цю інвазію, відповідно до сучасної термінології, можна розглядати як емерджентне захворювання. Незважаючи на деякий прогрес у боротьбі з дирофіляріозом, цей зооноз залишається значною проблемою для здоров'я людства та собаководства. Успіх боротьби з дирофіляріозом залежить у першу чергу від своєчасно поставленого діагнозу. На жаль, в Україні застосовуються тільки традиційні паразитологічні дослідження з мікроскопічним виявленням мікрофілярій в крові тварин з подальшим визначенням їх видової належності за морфологічними ознаками. При цьому, не враховується той факт, що 25 % випадків захворювання протікає в амікрофіляріємичній формі, коли мікрофілярії відсутні у периферичній і венозній крові, а методи візуалізації, такі як ультразвук, рентгенографія, електрокардіографія є чутливими для обстеження на наявність тільки дорослих нематод. Тому розробка молекулярних та імунобіологічних тестів для інфекційної діагностики та епізоотичного моніторингу дирофіляріозу є пріоритетним напрямком досліджень вчених багатьох країн.

Матеріали і методи. Збір та аналіз даних щодо епізоотології та екогеографії дирофіляріозу проводили на підставі даних ветеринарних клінік, стерилізаційних пунктів безпритульних тварин міст Харкова, Одеси, Дніпропетровська та власних даних за період з січня до листопада 2011 р. При цьому, враховували породу, стать, вік, господарське призначення тварин, тип їх утримання, клінічні ознаки та сезонні особливості захворювання.

Для підтвердження діагнозу на дирофіляріоз використовували проби крові від собак з клінічними ознаками захворювання, які досліджували, згідно з СОУ 85.20-37-632:2007 «Ветеринарна медицина. Методи лабораторної діагностики філяріатозів».

Фіксовані етанолом мікрофілярії фарбували за Романовським-Гімза та вивчали видову належність за морфологічними ознаками до виду (Schrey C.F., Trautvetter E., 1988). Видову належність статевозрілих нематод визначали за морфологічними ознаками, згідно з СОУ 85.20-37-632:2007 «Ветеринарна медицина. Методи лабораторної діагностики філяріатозів» з визначенням екстенсивності (E1) та інтенсивності інвазії (I1).

Клінічні та біохімічні показники крові вивчали на собаках, спонтанно інвазованих *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*) і *Dirofilaria repens* (*D. repens*). Клінічний аналіз крові проводили загальноприйнятими методами з визначенням кількості клітин крові (еритроцитів та лейкоцитів) з підрахунком лейкоформули та дослідження вмісту гемоглобіну і ШОЕ. Серед біохімічних показників вивчали активність індикаторних ферментів аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази за методом Райтмана-Френкеля та рівень сечовини за кольоровою реакцією з дицетилмонооксидом і креатиніну за методом Яффе-Поппер з депротейнізацією пікріновою кислотою.

При вивченні антигенних властивостей дирофілярій використовували соматичні та екскреторно-секреторні антигени виготовлені різними методами. Соматичний антиген дирофілярій готували із статевозрілих нематод самок і самців *D. immitis*, яких вилучали хірургічним шляхом або при патологоанатомічному розтині собак, а також з личинкових форм різних стадій розвитку (мікрофілярій), яких отримували шляхом центрифугування гемолізованої дистильованою водою крові хворих собак. З метою збільшення концентрації білку в антигені нематод після багаторазового відмивання фізіологічним розчином занурювали в 0,25 М водяний розчин сахарози (у співвідношенні 1:3). Проби заморожували та проводили механічну і ультразвукову гомогенізацію гельмінтів.

Підвищення специфічності антигену дирофілярій проводили шляхом додаткової очистки в ацетоні від ліпідів, суміш центрифугували осад видаляли, а надосадову рідину, яка містила антиген, використовували в подальшій роботі.

Для отримання екскреторно-секреторного антигену дирофілярій використовували метаболіти, які отримували при культивуванні личинок *D. immitis* у рідкому поживному середовищі 199 та Ігла в співвідношенні 50:50 з додаванням 10 % аглобулінової сироватки великої рогатої худоби або аутологічної сироватки за температури 37 °С впродовж 7 діб. Метаболіти личинок очищали центрифугуванням і заморожували для подальшого використання. Збір метаболітів припиняли при загибелі 30 % нематод.

Контроль на контамінацію мікрофлорою отриманих антигенів проводили згідно з ДСТУ 4483:2005 «Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначання бактеріальної і грибної контамінації». Вміст білку визначали за методом Бредфорда (1976).

Аналіз діагностичної ефективності отриманих антигенів дирофілярій проводили з визначенням їх чутливості та специфічності в РІД за загальноприйнятими методиками з використанням сироваток крові собак хворих на серцевий дирофіляріоз (*D. immitis*), підшкірний дирофіляріоз (*D. repens*), вільних від інвазій та собак хворих на токсокароз. Перед постановкою РІД від кожної тварини кров перевіряли на наявність мікрофілярій, а фекалії – яєць гельмінтів загальноприйнятими паразитологічними методами.

Активність отриманих соматичного та екскреторного антигенів дирофілярій визначали в РІД шляхом їх титрування з позитивною до *D. immitis* сироваткою крові собаки. Реакцію враховували через 48-72 години.

Результати досліджень. Аналізуючи епізоотичну ситуацію і екогеографію дирофіляріозу в Південно-східному регіоні України було досліджено 287 проб крові від собак з клінічними ознаками дирофіляріозу. Позитивний діагноз був поставлений в 80 випадках, що становило 28 % від загальної кількості тварин, які були обстежені. У досліджених зразках крові собак у 89 % спостерігали інвазування *D. immitis*, 9 % – *D. repens* та у 2 % – одночасне інвазування обома видами збудників. Отримані дані вказували на значну розповсюдженість дирофіляріозу серед собак на території Південно-східного регіону України.

Дирофіляріоз собак реєстрували в м. Харкові та двох районах Харківської області (Великобурлуцькому та Балаклеївському) у 59 випадках, у 14 випадках в м. Одесі, та семи випадках в м. Дніпропетровськ.

Мікрофілярії виявляли з інтенсивністю від 2 до 800 личинок в 1 см³ крові. Довжина тіла мікрофілярій *D. immitis* становила 250-320 мкм при ширині 4-6 мкм, личинки *D. repens* мали більші розміри: 265-370 мкм у довжину і 6-7 мкм в ширину.

У залежності від виду збудника клінічні прояви дирофіляріозу протікали в декількох формах: серцевій (при інвазуванні *D. immitis*) та шкірній (*D. repens*). При субклінічному перебігу хвороби істотних змін у поведінці собак не відзначали, в половині випадків захворювання перебігало безсимптомно, тварини мали добрий апетит. При вивченні клінічного аналізу крові відзначали мікрофіляремію

та еозинофілію в крові у всіх собак. Біохімічні показники залишалися в межах фізіологічної норми. (табл. 1)

Таблиця 1 – Аналіз клінічних ознак та показників лабораторних досліджень при різних формах дирофіляріозу у період з січня до листопада 2011 р.

Показники	Форма хвороби					
	Серцева (<i>D. immitis</i>)				Шкірна (<i>D. repens</i>)	
	Субклінічна		Тяжка		Субклінічна	
	Гол	%	Гол	%	Гол	%
<i>Клінічні ознаки</i>						
Швидка втомлюваність	-	-	14	100	-	-
Втрата маси тіла	10	14	14	100	-	-
Задишка	-	-	3	21	-	-
Кашель	-	-	7	50	-	-
Ціаноз слизових оболонок	-	-	7	50	-	-
Асцит	-	-	1	7	-	-
Парез	-	-	1	7	-	-
<i>Лабораторна діагностика</i>						
Мікрофіляремія	69	100	14	100	7	100
Еозинофілія	43	62	12	86	6	86
Лейкоцитоз	-	-	11	78	3	43
Здвиг лейкоформули вліво	-	-	7	50	-	-
Підвищення рівня АсАт	3	-	14	100	1	14
Підвищення рівня АлАт	1	-	14	100	3	43
Підвищення рівня сечовини	-	-	13	90	2	28
Підвищення рівня креатинину	-	-	13	90	3	43

Тяжкий перебіг серцевої форми дирофіляріозу у 18 % собак, проявлявся швидкою втомлюваністю, втратою значної маси тіла та ознаками серцевої недостатності (задишка, ціаноз слизових оболонок та кашель вночі). При лабораторних дослідженнях у тварин обов'язково спостерігали підвищення рівня індикаторних ферментів АсАт та АлАт, які з'являються в крові після руйнування міоцитів та гепатоцитів. Крім того, в 90 % собак відзначали підвищення рівня креатеніну та сечовини, які є побічними продуктами обміну речовин і характеризують функціональний стан нирок.

У тварин зі шкірною формою хвороби, збудником якої є *D. repens* відзначали мікрофіляремію в крові та ексудаті, еозинофілію та лейкоцитоз.

Вік заражених собак складав від 2 до 12 років, з яких 47 % були кобелі та 53 % – суки. Найбільш високу екстенсивність інвазії (Е) виявили в службових 64 % та безпритульних 26 % собак. Трохи нижче була ЕІ у мисливських 7 % собак, спорадичні випадки інвазії виявлені в кімнатно-декоративних собак.

Для вивчення антигенних властивостей дирофілярій були розроблені методики виготовлення соматичного та екскреторно-секреторного антигенів *D. immitis*. Усього було отримано 34 см³ рідкого соматичного антигену з концентрацією білку 10,1 мг/см³.

З метою одержання екскреторно-секреторних антигенів *D. immitis* була вивчена здатність мікрофілярій *D. immitis* до культивування в поживних середовищах. Дослідним шляхом були підібрані оптимальні параметри їх культивування в середовищі Ігла та 199 з додаванням сироваток крові тварин. Було встановлено, що при культивуванні 100±25 личинок мікрофілярій в 1 см³ поживного середовища з щоденною його заміною, загибель 30 % личинок наступала вже на 2 добу, мікрофілярії були малорухливими або нежиттєздатними. При збільшенні кількості поживного середовища до 3 см³ з використанням тієї ж кількості личинок 30 %-ва їх загибель наступала на 4 добу, а при додаванні 5 см³ поживного середовища строк їх культивування збільшувався до 6-7 діб. На вихід екскреторно-секреторного антигену, який визначали за вмістом білку в супернатанті, та життєздатність мікрофілярій впливала як видова належність сироваток (собаки або аглобулінова великої рогатої худоби), які входять до складу поживного середовища для культивування мікрофілярій, так і її кількість. Найбільш придатною виявилася аглобулінова сироватка ВРХ в концентрації 10 %. При її застосуванні мікрофілярії залишалися активними, а вміст білку у середовищі суттєво не змінювався в порівнянні з групами, де використовували сироватку крові собаки: 15-17 г/л проти 18-20 г/л, відповідно. Тому в подальших дослідженнях недоцільним було застосувати сироватку собаки, так як існувала вірогідність наявності в ній антигенів збудників інших захворювань та можливості перекрестних серологічних реакцій в майбутньому. Усього було отримано 180 см³ рідкого екскреторно-секреторного антигену з концентрацією білку 17,3 мг/см³. Який було заморожено для подальшого використання. Антиген зберігали за температури – 20 °С

Для визначення специфічності соматичного та екскреторно-секреторного антигенів дирофілярій *D. immitis* використовували сироватки крові собак хворих серцевою та підшкірною формами дирофіляріозу, вільних від інвазій та собак хворих на токсокароз (табл. 2, 3). Перед постановкою імуносерологічних реакцій кров та фекалії від кожної тварини перевірялися на наявність мікрофілярій та яєць гельмінтів паразитологічними методами.

Таблиця 2 – Діагностична специфічність соматичного антигену *D. immitis* в РІД

Сироватки крові собак	Кількість проведених досліджень	Результати РІД		Специфічність %
		позитивні	негативні	
Сироватка крові собак хворих на серцевий дирофіляріоз	25	25	–	100
Сироватка крові собак хворих на підшкірний дирофіляріоз	5	–	5	100
Сироватки крові собак вільних від інвазій	10	–	10	100
Сироватка крові собак хворих на токсокароз	15	–	15	100

Розділ 1. Біобезпека та біозахист у ветеринарній медицині, емерджентні трансмісивні та транскордонні хвороби тварин

Таблиця 3 – Діагностична специфічність екскреторно-секреторного антигену *D. immitis* в РІД

Сироватки крові собак	Кількість проведених досліджень	Результати РІД		Специфічність %
		позитивні	негативні	
Сироватка крові собак хворих на серцевий дирофіляріоз	25	25	–	100
Сироватка крові собак хворих на підшкірний дирофіляріоз	5	–	5	100
Сироватки крові собак вільних від інвазій	10	–	10	100
Сироватка крові собак хворих на токсокароз	15	1	14	93

Як видно з таблиць 2 та 3, специфічність соматичного антигену *D. immitis* з сироватками крові дослідних собак становила 100 %, тоді як при використанні екскреторно-секреторного антигену специфічність склала тільки 93 %.

Активність отриманих антигенів дирофілярій визначали в РІД. Для цього антигени титрували з позитивною до *D. immitis* сироваткою крові собаки та інкубували за температури 24 °С. Реакцію враховували за 48-72 години.

Було встановлено, що обидва антигени були активними та давали лінію преципітації. Більш активним виявився соматичний антиген, його активність визначалася в розведенні 1:2. При цьому екскреторно-секреторний антиген був активним лише в нативному (нерозведеному) стані.

Перспектива подальших досліджень. У подальшому планується провести фракціонування екскреторно-секреторного та соматичного антигенів, вивчити антигенні властивості отриманих білкових фракцій з метою створення тест-системи ІФА для діагностики дирофіляріоза.

Висновки. 1. Досліджено екогеографію дирофіляріозу міст Харкова, Одеси, Дніпропетровська за період з січня по листопад 2011 р. Позитивний діагноз на дирофіляріоз був поставлений в 28 % від собак підозрюваних в захворюванні. Дирофіляріоз собак реєстрували в м. Харкові та Харківській області (Великобурлуцькому та Балаклєвському районах) в 59 випадках, в 14 випадках реєстрували в м. Одесі, та 7 випадках в м. Дніпропетровськ.

2. Вивчено видовий склад дирофілярій, які паразитують у собак на території Південно-східного регіону України. У зразках крові собак виявлено 89 % інвазування *D. immitis*, 9 % – *D. repens* та у 2 % – одночасне інвазування обома видами збудників.

3. Розроблені методи виготовлення соматичного та екскреторно-секреторного антигенів *D. immitis*. Специфічність соматичного антигену *D. immitis* з сироватками крові дослідних собак становила 100 %, екскреторно-секреторного антигену – 93 %. Обидва антигени були активними та давали чітку лінію преципітації в РІД. Більш активним виявився соматичний антиген, його активність визначалася в розведенні 1:2.

CIRCULATION OF DOG DIROFILARIOSIS IN SOUTH-EASTERN REGION OF UKRAINE AND EFFICIENCY OF IMMUNODIFFUSION TEST IN ITS DIAGNOSIS

Keleberda M.I., Oleshko A.Y., Kuznetsov E.P.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Furda I.V.

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv

*Data about spread of dog dirofilariasis in Kharkiv, Odessa and Dnipropetrovsk regions is presented in the paper. Dirofilariasis was diagnosed in 28 % of examined blood samples of suspected dogs, and in 89 % of cases there was observed invasion by *D. immitis*, in 9 % – by *D. repens* and in 2 % – simultaneous invasion by both types of aetiological agents. There have been received somatic and excretory -secretory antigens *D. immitis*. Specificity of somatic antigen *D. immitis* with blood serum of experimental dogs in immunodiffusion test was 100 %, while at the use of the excretory antigen specificity was only 93 %. Somatic antigen was more active, its activity was detected in dilution 1:2.*

УДК 619:616.98:579:843.96

ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗБУДНИКА САПУ *BURKHOLDERIA MALLEI*

Козій Р.В.

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

Скрипник А.В.

Блек енд Вітч Спешіал Проджектс Корп., м. Київ

Скрипник В.Г.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Сапу – небезпечне зооантропонозне захворювання. До сапу чутливі коні, м'ясоїдні, верблюди і людина. Хоча на території СРСР та розвинених країн Заходу сапу було ліквідовано у першій половині ХХ ст., інтерес до вивчення цього захворювання в останні роки суттєво зріс. Унаслідок розвитку міжнародної торгівлі, а також загрози біотероризму, існує небезпека занесення збудника сапу, *Burkholderia mallei*, на вільні території [1]. Розвиток генетичних та молекуло-біологічних методів дослідження дозволив краще зрозуміти патогенез хвороби, ультраструктуру будову збудника, розробити більш надійні методи лабораторної діагностики сапу, міжвидової диференціації та внутрішньовидового типування. Однак, багато факторів патогенності, антибіотикорезистентності, генетичної варіабельності залишаються не до кінця з'ясованими. Тому подальші генетичні дослідження збудника сапу залишаються