Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

Національний аграрний університет

# ВАСИЛИК Наталія Степанівна

**УДК: 619:616.995.132:636.7**

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ТА АДАПТАЦІЙНО-**

**КОМПЕНСАТОРНІ РЕАКЦІЇ В ОРГАНІЗМІ СОБАК**

**ЗА ДИРОФІЛЯРІОЗУ**

16.00.02 – патологія, онкологія та морфологія тварин

### Автореферат

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата ветеринарних наук**

**Київ – 2004**

## Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному аграрному університеті Кабінету Міністрів України

**Науковий керівник -** доктор ветеринарних наук, заслужений діяч науки і техніки України, професор **Мазуркевич Анатолій Йосипович,** Національний аграрний університет, завідувач кафедри патологічної фізіології та імунології тварин, академік-секретар відділення ветеринарної медицини Української академії аграрних наук

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, професор **Горальський Леонід Петрович,** Державний агроекологічний університет, завідувач кафедри анатомії і гістології

кандидат ветеринарних наук, доцент **Тарасевич Вадим Леонідович,** Білоцерківський державний аграрний університет, завідувач кафедри нормальної та патологічної фізіології

**Провідна установа -** Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної

медицини УААН, лабораторія патоморфології,

м. Харків

Захист дисертації відбудеться “ ” \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2004 р. о \_\_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному аграрному університеті за адресою: м. Київ-41, вул. Героїв оборони, 15, навчальний корпус 3, аудиторія 65

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного аграрного університету за адресою: 03041, м. Київ-41, вул. Героїв оборони, 13, навчальний корпус 4, к. 41

Автореферат розісланий “ ” \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2004 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Міськевич С.В.

#### **ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Вивченню ролі етіопатогенетичних факторів у розвитку паразитарних хвороб до цього часу приділялося мало уваги. Разом з тим без глибокого розуміння патогенезу захворювання неможливо розробити науково обґрунтовані лікувальні заходи. Останнім часом в Україні привертає до себе увагу дирофіляріоз собак, який має тенденцію до поширення із субтропіків у регіони з помірним кліма­том (Pampiglione S., Canestri Trotti G., Rivasi F., 1995; Schrey C.F., Trautvetter E., 1998). Тропічний гельмінтоз швидко адаптувався до клімату помірних широт і на сьогодні виявляється на території всієї України (Карвовський О. та ін., 1997; Поживіл А.І. та ін., 1999, Величко С.В. та ін., 2000).

Однак, до цього часу повністю не розкрито характер змін в організмі собак та перебіг захисно-компенсаторних процесів при інвазії, не встановлено вид гельмінта, недостатньо вивчена біологія та поширення дирофіляріозу в Україні, практично відсутні дані щодо розвитку паразита в проміжних живителях, якими є комарі родів Culex, Aedes, Anopneles.

Існуючі на сьогодні методи діагностики дирофіляріозу в Україні недосконалі. Вони базуються на виявленні мікрофілярій у периферичній крові. Однак, у багатьох хворих тварин, мікрофілярії можуть бути відсутні (сезонні та добові коливання появи мікрофілярій в крові, одностатева інвазія, інтенсивна імунна реакція організму проти мікрофілярій, застосування мікрофілярицидів, ектопічна локалізація паразитів та ін.). Крім того, існуючі діагностичні тести не можуть застосовуватись для діагностики дирофіляріозу людей, в організмі яких дирофілярії рідко досягають статевої зрілості і не продукують мікрофілярій (Pampiglione S., Rivasi F., 2000).

Відсутність макрофілярицидних препаратів в Україні (дигідрохлорид меласарміна і тіацертарсамід натрію) обмежує проведення ефективних методів лікування і профілактики дирофіляріозу з метою скорочення природного резервуару гельмінтозу.

В зв’язку з цим, на сьогодні актуальним є дослідження ролі етіологічних і патогенетичних чинників, що зумовлюють розвиток патологічних змін та формування адаптаційно-компенсаторних процесів в організмі собак за дирофіляріозу, а також розробка науково обґрунтованих способів діагностики, профілактики та лікування даного гельмінтозу.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є частиною наукової теми 110/2-ф “Дослідити участь окремих органів і систем організму тварин у формуванні адаптаційно-компенсаторних реакцій під впливом чинників довкілля”, яка виконується на кафедрі патофізіології та імунології тварин факультету ветеринарної медицини Навчально-наукового інституту (ННІ) ветеринарної медицини, якості і безпеки продукції АПК Національного аграрного університету (НАУ) (державний реєстраційний номер 0198 U 004092).

**Мета і задачі дослідження.** *Мета роботи* полягала у визначенні ролі етіопатогенетичних факторів у розвитку структурних та функціональних порушень в організмі собак за дирофіляріозу залежно від інтенсивності інвазії, а також розробці науково обґрунтованих способів його діагностики і лікування.

Виходячи з наміченої мети, у роботі були поставлені наступні задачі:

* здійснити підбір тварин з різною інтенсивністю інвазії мікрофіляріями для досліджень;
* дослідити біологічні особливості гельмінтозу з метою встановлення виду дирофілярій і аналізу поширення гельмінтозу серед собак у зоні Українського Полісся;
* провести оцінку ефективності різних методик виявлення мікрофіляремії;
* провести експериментальне зараження комарів личинками нематоди Dirofilaria repens для встановлення проміжних живителів нематоди;
* виявити основні клініко-патогенетичні особливості перебігу гельмінтозу в собак;
* дослідити та проаналізувати морфологічні, біохімічні та імунобіологічні показники крові собак;
* випробувати новий вітчизняний ПЛР-діагностикум інвазії D. repens;
* застосувати комплексні методи корекції патологічних змін за дирофіляріозу.

*Об'єкт дослідження –* адаптаційно-компенсаторні процеси у собак, уражених збудником дирофіляріозу;

*Предмет дослідження* **–** венозна кров, асцитна рідина, пунктати м’яких тканин з місць локалізації гельмінта, тканини печінки, нирок, серця, легень, статевозрілі дирофілярії та їх личинки.

*Методи досліджень*– гематологічні (визначення вмісту гемоглобіну, кількості еритроцитів, лейкоцитів, виведення лейкоцитарної формули), біохімічні (визначення вмісту білірубіну, сечовини і азоту сечовини, креатиніну, загального білка, глюкози, натрію і калію, активності аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспартатамінотрансферази (АсАТ) крові та кислої фосфатази мікрофілярій), імунологічні (визначення кількості Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій, В-лімфоцитів, фагоцитарноїактивності (ФА, %) та інтенсивності фагоцитозу (ІФ, мікробних клітин), вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК)), цитогістологічні, біотехнологічні (визначення присутності залишкової кількості ДНК паразита в організмі носія інвазії за допомогою ланцюгової полімеразної реакції (ПЛР)), гельмінтоларвоскопічні, гельмінтоскопічні і статистичні.

**Наукова новизна.** Виявлена залежність характеру перебігу хвороби і патологічних змін при інвазії D. repens від кількості наявних в організмі інвазійних елементів. За нашими дослідженнями мікрофілярії, являючись постійним біологічним подразником в організмі дефінітивного живителя, зумовлюють зміну кількісного та якісного складу крові, порушення обміну речовин, розвиток деструктивно-дистрофічних процесів у паренхіматозних органах, виникнення імунологічних реакцій.

Уперше в Україні нами ідентифіковано вид гельмінту - Dirofilaria repens за допомогою специфічного фарбування мікрофілярій на кислу фосфатазу.

Проведені експериментальні дослідження підтвердили здатність досліджуваних видів комарів (An. m. аtroparvus, C. р. mоlestus, Aedes aegypti L.) слугувати проміжними живителями нематоди D. repens в умовах України. Виходячи із результатів, припускається, що An. m. atroparvus у порівнянні з C. р. mоlestus і Aedes aegypti L. є більш придатним для розвитку личинок D. repens.

На основі власних клінічних спостережень виділено, крім безсимптомного перебігу, 4 основні форми дирофіляріозу, який спостерігався у спонтанно інвазованих D. repens собак Київського регіону: інтоксикаційна, шкірна, псевдопухлинних розростань та форма кардіо-гепато-ренальної недостатності.

Одержано позитивні результати у випробовуванні нового вітчизняного діагностикума інвазії D. repens за визначенням наявності залишкової кількості ДНК паразита в організмі носія інвазії в ПЛР (полімеразній ланцюговій реакції).

Доведена висока ефективність запропонованої схеми використання макро- і мікрофілярицидних препаратів у комплексі з патогенетичною і гомеопатичною терапією для корекції патологічних змін при дирофіляріозі собак.

**Практичне значення роботи.** На підставі результатів проведених досліджень розкрито важливі клініко-патогенетичні особливості перебігу інвазії D. repens у собак, виявлено характер ушкоджуючої дії тривалої мікрофіляремії на клітинному і органному рівнях організму. Одержані дані змушують переглянути відношення до виду D. repens як до умовно патогенного. Результати досліджень можуть бути використані як у навчально–науковому процесі, так і в практичній ветеринарній медицині.

Результати експериментальних досліджень по зараженню комарів мікрофіляріями можуть використовуватись ветеринарними спеціалістами для моніторингу та прогнозування поширення дирофіляріозу тварин, а також санітарно-епідеміологічними працівниками з метою вивчення епідеміологічної ситуації і розроблення ефективних методів захисту людей від даного антропозоонозу.

Результати морфологічних досліджень дирофілярій та визначення їх видової приналежності являють собою цінний матеріал для паразитологів з метою подальшого вивчення цього гельмінтозу.

Уперше в Україні розроблена і випробувана система праймерів для ПЛР-діагностики, яка може бути застосована у ветеринарній практиці для верифікації виду гельмінта і моніторингу ефективності проведеного лікування, а при низькій мікрофіляремії – для діагностики дирофіляріозу. При проведенні епідеміологічних досліджень з її допомогою можна виявляти ДНК личинок дирофілярій в проміжному господарі, що важливо для виявлення територій, потенційно небезпечних для поширення гельмінтозу.

Одержані результати щодо корекції патологічних змін при інвазії D. repens можуть використовуватись практикуючими лікарями ветеринарної медицини в лікувально–профілактичних заходах при дирофіляріозах м’ясоїдних тварин.

Дані дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі та наукових дослідженнях на кафедрах паразитології і тропічної ветеринарії НАУ, внутрішніх хвороб тварин та клінічної діагностики Одеського державний аграрного інституту, фармакології та токсикології, паразитології та рибництва, патологічної фізіології, патанатомії та гістології Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького, паразитології, патанатомії та ветсанекспертизи Полтавської державної аграрної академії, нормальної і патологічної фізіології Білоцерківського державного аграрного університету, що підтверджено картками зворотного зв’язку.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом особисто виконані підбір матеріалу та методик, більшість клініко-експериментальних досліджень за темою дисертаційної роботи, огляд літера­тури, статистична обробка та аналіз отриманих даних, сформульовані вис­новки та пропозиції виробництву. Вивчення біології дирофілярій проведені спільно з працівниками Інституту зоології ім. І.І. Шмальгаузена НАН України, м. Київ, біотехнологічні дослідження – разом із працівниками Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, м. Київ та лабораторії генної інженерії Російського гематологічного центру, м. Москва.

**Апробація результатів досліджень.** Основнірезультати дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на: ІІ Всеукраїнській науково-практичній конференції ветеринарних патологів (21-24 листопада 2001 р.); ІІ міжнародній науково-практичній ветеринарній конференції з проблем дрібних тварин (28-30 травня 2003 р., м. Одеса); міжнародній науково-практичній конференції “Актуальні проблеми ветеринарної медицини в умовах сучасного ведення тваринництва” (26 травня – 2 червня 2003р., м. Феодосія, АР Крим); VIII міжнародній науково-практичній конференції “Проблеми ветеринарного обслуговування дрібних домашніх тварин” (16-17 жовтня 2003 р., м. Київ); конференціях професорсько-викладацького складу, наукових співробітників та аспірантів навчально-наукового інституту ветеринарної медицини, якості і безпеки продукції агропромислового комплексу НАУ (м. Київ, 2001–2004 рр.); науково-практичному семінарі Київського Товариства практикуючих лікарів ветеринарної медицини по темі: «Дирофіляріоз собак в Україні: клініко-патогенетичні особливості перебігу інвазії Dirofilaria repens та проблеми діагностики гельмінтозу» (23 листопада 2001р.); науково-практичному семінарі “Дирофіляріоз дрібних домашніх тварин” (27 лютого 2003 року, НАУ, м. Київ).

**Публікації.** Результати досліджень за темою дисертації висвітлені у 8 наукових статтях, у т.ч., в журналі “Ветеринарна медицина України” (2), у збірниках “Вісник Аграрної академії наук України” (1), “Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник” (1), “Науковий вісник Національного аграрного університету” (2), “Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького” (2), а також у тезах доповідей наукової конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників та аспірантів (3) та в матеріалах міжнародних науково-практичних конференцій з проблем дрібних тварин (2).

**Структура та об'єм дисертації.** Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів та методик досліджень, результатів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, виснов­ків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел. Робо­та викладена на 174 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 41 рисунком, 18 таблицями. Список використаних літературних джерел включає 322 джерел, у тому числі – 221 далекого зарубіжжя.

##### ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

**Матеріал та методики дослідження**

З метою виявлення наявності мікрофілярій у крові тварин були використані собаки різного віку, статі та породи, спонтанно інвазовані дирофіляріями. Крім того, нами було обстежено 21 собака породи кавказька і німецька вівчарки віком 1,5-4 роки, що знаходилися в розпліднику військової частини №3001 МВС України в м. Києві та 71 собака із притулку для бродячих тварин в м. Бородянці Київської області.

Для проведення гематологічних та імунологічних досліджень було сформовано 3 групи собак: І – низький ступінь мікрофіляремії (1-50 мікрофілярій в 1 мл крові); ІІ – високий ступінь мікрофіляремії (більше 100 мікрофілярій в 1 мл крові); ІІІ – контроль (амікрофіляремія).

За симптоматичною характеристикою підібрано 4 групи тварин: інтоксикаційна форма (36); шкірна форма (49); форма псевдопухлинних розростань (17); форма гепато-кардіо-ренальної недостатності (18).

Всі дослідні тварини перед дослідженнями були імунізовані полівалентними вакцинами проти чуми м’ясоїдних, інфекційного гепатиту, аденовірусної інфекції, парагрипу м’ясоїдних, парвовірусного ентериту собак, лептоспірозу і сказу, а також дегельмінтизовані комплексними препаратами широкого спектру дії. Ефективність дегельмінтизації перевіряли за 3 дні до початку досліджень шляхом копроскопії.

Кров для дослідження на дирофіляріоз відбирали з підшкірної вени передпліччя у одноразові шприци з антикоагулянтами (гепарин або цитрат натрію) вранці або ввечері, під час найвищої активності мікрофілярій в периферичному судинному руслі. Для збільшення ймовірності виявлення мікрофіляремії у собак проводили повторне двократне дослідження крові з інтервалом 7 діб. Виготовлені мазки крові забарвлювали за Папенгеймом.

Мікрофіляремію визначали різними способами: за методом Кнотта в модифікації I. Lindsey, I. Russel, 1965 (цитовано за Котельниковим Г. А., 1984), у препараті “товста крапля” (цитовано за Котельниковим Г.А., 1984), у сироватці крові (цитовано за Поживілом А.І., Горжеєвим В.М.,1999), за методикою кількісного підрахунку мікрофілярій у лічильній камері за Denham та ін. (цитовано за ВОЗ, 1975).

Видову належність мікродирофілярій визначали за активністю кислої фосфатази за Goldberg A.F., Barka T. (1962). За цим методом вдавалось ідентифікувати мікродирофілярій на видовому рівні: D. immitis – по забарвленню анальної та екскреторної пори; D. drancunculoides – анальної пори та основного тіла; D. repens – по забарвленню тільки анальної пори; D. reconditum – по дифузному забарвленню основного тіла (Ortega-Mora L., Gomez-Bautista M., Rojo-Vazquez F., 1989; Schrey C.F., Trautvetter E., 1998).

З метою встановлення наявності мікрофілярій та гістопатологічних змін тканин у собак з мікрофіляремією проводили цитологічне дослідження пунктатів (черевної порожнини, новоутворень) і мазків-відбитків з виразкових уражень шкіри і м’яких тканин, а також гістологічне дослідження тканин внутрішніх органів, пофарбованих гематоксиліном та еозином (Меркулов Г.А.,1961).

В одержаних пробах крові визначали: кількість еритроцитів та лейкоцитів шляхом підрахунку в камері Горяєва; вміст гемоглобіну − гемоглобін-ціанідним методом; у мазках, пофарбованих за Папенгеймом, проводили підрахунок лейкоцитів, виводили лейкограму; вміст білірубіну визначали методом Ієндрашика, Клеггорна і Грофа (1975); вміст сечовини і азоту сечовини − за кольоровою реакцією з диацетилмонооксимом; креатинін − за кольоровою реакцією Яффе (метод Поппера) (1978); аланінамінотрансферазу (АлАТ), аспартатамінотрансферазу (АсАТ) − колориметричним динітрофенілгідразиновим методом (за Райтманом−Френкелем, 1957); загальний білок − за біуретовою реакцією (за методом Кінгслея–Вейксельбаума); глюкозу − в реакції з ортотолуїдином; вміст калію і натрію − методом полум’яної фотометрії (фотометр “ПАЖ”, Україна); кількість Т-лімфоцитів – у тесті спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана (Е-РУК); кількість В-лімфоцитів – у тесті спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана (ЕАК-РУК); кількість теофілінрезистентних Т-лімфоцитів (Т-хелперів), кількість теофілінчутливих Т-лімфоцитів (Т-супресорів) та кількість Т-активних лімфоцитів – у тесті спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана; фагоцитарнуактивність (ФА, %) та фагоцитарний індекс (Фİ, мікробних клітин) – за методикою Чумаченка В.Ю., (1975), тест-культура Staphylococcus aureus, штам 209-Р; кількість циркулюючих імунних комплексів (ЦİК) в крові – спектрофотометричним методом з поліетіленгліколем – 6000 (Гриневич Ю. А., Алферов А. Н., 1981).

Для корекції патологічних змін в організмі собак за дирофіляріозу було проведено дві серії дослідів: у першій серії використали піддослідних собак, яких сформували в групи на основі симптоматичної класифікації дирофіляріозу; їм призначали мікрофілярицидну, патогенетичну і симптоматичну терапію; у другій серії дослідів була сформована група собак із симптомами враження шкіри; в цій групі застосували макрофілярицидну, мікрофілярицидну і патогенетичну терапію.

Собакам порівняльної групи призначали загальноприйняту мікрофілярицидну, макрофілярицидну і патогенетичну терапію, а собакам дослідної групи – додатково призначали симптоматичну терапію із застосуванням комплексних гомеопатичних препаратів фірми “Heеl” (Гамальчик П., 1997).

З мікрофілярицидною метою застосовували івомек (Ivomec, Merial) – мікрофілярицид, діюча речовина івермектин, який одержують шляхом ферментації гриба Streptomyces avermitylis. Як макрофілярицид використовували Potassium arsenite, представлений для досліджень доктором W. Tarello (Італія). Для патогенетичної терапії застосовували фраксіпарін (попереджує тромбоутворення під час масової загибелі мікрофілярій) та розчин Рінгер-Лока (з метою дезінтоксикації).

Контроль за мікрофіляремією здійснювали за методом Кнотта та методикою кількісного визначення мікрофілярій у лічильній камері по Denham та ін. (1971) до початку лікування, а потім на десяту, двадцяту і тридцять п’яту добу від початку лікування.

Проби крові для гематологічних досліджень при проведенні обох серій дослідів відбирали до початку лікування, а потім на десяту і тридцять п’яту добу від початку лікування. У крові визначали: кількість еритроцитів та лейкоцитів шляхом підрахунку їх в камері Горяєва; вміст гемоглобіну − гемоглобін-ціанідним методом.

Наявність залишкової кількості ДНК паразита в організмі собаки визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (Favia G., Lanfrancotti A., Della Torre A., 1996; Favia G., Lanfrancotti A., Della Torre A., et al., 1997; Favia G., Cancrini G., Ricci I., et al., 2000). Олігонуклеотидні праймери Rep1 і Rep2 синтезували на приладі “Gene Assembler” (“Pharmacia”, Швеція) фосфоамідним методом у відповідності з відомими нуклеотидними послідовностями (Favia G., Lanfrancotti A., Della Torre A., 1996; Favia G., Lanfrancotti A., Della Torre A., et al., 1997; Favia G., Cancrini G., Ricci I.,Bazzocchi C., et al., 2000).

Для експериментального зараження мікрофіляріями D. repens використовували комарів трьох видів: *Culex* *pipiens* *mоlestus F.*, *Anopheles* *maculipennis atroparvus Mg.* і *Aedes aegypti L..* В експерименті використовували гоноактивних самок комарів, яких вирощували й утримували в лабораторних умовах і які не були заражені багатоклітинними паразитами.

Для експериментального зараження комарів використано собак із притулку для бездомних тварин у Київській області, з попереднім діагнозом дирофіляріоз (собака №1 з мікрофіляремією – 2400 мікрофілярій в 1 мл крові і собака №2 з мікрофіляремією 6300 мікрофілярій в 1 мл крові).

Контроль за розвитком личинок здійснювали періодичним розтином комарів усіх видів з підраховуванням кількості виявлених личинок D. repens та реєстрували їх локалізацію і зміну морфологічної будови.

Отриманий цифровий матеріал опрацьований статистично методом Монцевічюте-Ерінгене Е.В. (1964), з використанням ПК ІВМ-486 (програма Vetstat, О.В. Левчій, 1997).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

**Визначення видової приналежності дирофілярій та їх локалізації в організмі собаки.** Для визначення видової приналежності дирофілярій проводили видоспецифічне фарбування виявлених мікрофілярій на кислу фосфатазу, а також морфологічне дослідження статевозрілих дирофілярій.

При цитохімічному дослідженні мікрофілярій, виявлених у мазках периферичної крові та в пунктатах уражень шкіри, встановлено, що в усіх випадках їх тіло має характерну яскраву пляму активності тартрат-резистентної кислої фосфатази в зоні анальної пори. Активність лужної фосфатази була відсутня, PAS-позитивні речовини не визначались. Така цитохімічна характеристика є типовою для дирофілярій виду D. repens (Schrey C.F., Trautvetter E., 1998). Статевозрілі дирофілярії виявляли набагато рідше, ніж мікрофілярії. Більшість із них знаходили під час оперативних втручань у собак (видалення пухлин, кастрація, герніотомія та ін.). Серед знайдених 23 екземплярів дирофілярій виявилось 3 самці та 20 самок. За морфологічними ознаками виявлених дирофілярій віднесено до виду Dirofilaria repens.

Встановлено, що гельмінти локалізувались в основному у підшкірній клітковині і міжм’язових прошарках, активно рухались і вільно переміщувались по м’яких тканинах собаки. При патологоанатомічному розтині двох собак 70%виявлених статевозрілих дирофілярій локалізувалась у підшкірній клітковині в ділянці ліктьового і колінного суглобів.

Необхідно відмітити, що вперше в світі нами виявлені в Україні статевозрілі D. repens, які локалізувались у мошонці і в сім’яному канатику кота. Цей випадок слід враховувати при вивченні поширення дирофіляріозу в Україні.

**Результати виявлення мікродирофілярій у собак.** Мікрофіляремія є найбільш часто діагностованою ознакою дирофіряріозу собак. Розміри мікродирофілярій становлять: довжина 337 ± 31 мк, ширина 7 ±0,16 мк (n = 24).

Серед використаних методів діагностики мікрофіляремії найбільш простим, доступним і швидким є метод прямої мікроскопії краплі нативної крові. Метод дослідження сироватки крові також не потребує додаткових пристроїв, але у зв’язку із повільним виходом мікрофілярій із кров’яного згустку, необхідно більше часу. Модифікований метод Кнотта найбільш чутливий, оскільки дозволяє концентрувати мікрофілярії, підвищуючи точність діагностики, проте потребує наявності в лабораторії центрифуги.

Для визначення інтенсивності інвазії (İİ) собак мікрофіляріями проводили підрахунок личинок у крові за допомогою лічильної камери. Ступінь мікрофіляремії оцінювали за кількістю мікрофілярій у 1 мл нативної крові (мф/мл): наявність мікрофілярій від 1 до 50 екземплярів в 1 мл крові визначали як низький ступінь мікрофіляремії; 50-100 мф/мл – середній ступінь; більше 100 мф/мл - високий ступінь.

Серед 157 собак, спонтанно інвазованих дирофіляріями, було виявлено 50,3% з низьким ступенем мікрофіляремії, 38,9% тварин з середнім ступенем мікрофіляремії та 10,8% – з високим ступенем мікрофіляремії.

Слід відмітити, що İİ мікрофіляріями залежить від віку собак. Так, вища İİ реєструвалась переважно в собак віком 6,5±2,4 роки. Очевидно, щорічна реінвазія собак мікрофіляріями сприяла зростанню İİ за рахунок статевозрілих дирофілярій, і, відповідно, в послідуючі роки в крові реєстрували більшу кількість личинок.

Для визначення екстенсивності інвазії (Еİ) дирофіляріозу серед бездомних собак м. Києва було досліджено 71 собаку з притулку для бродячих тварин у м. Бородянці Київської області. У 21 тварини (30%) реєстрували мікрофіляремію. За даними Печерської районної в м. Києві державної лікарні ветеринарної медицини Еİ дирофіляріозу серед домашніх собак протягом 2000-2002 років становила 22%.

**Особливості перебігу інвазії Dirofilaria repens у собак.** За період дослідження з 2000 по 2002 роки було обстежено на дирофіляріоз 2657 собак, у 540 (20,3%) з них виявлена мікрофіляремія (табл.1).

Слід відмітити, що серед інвазованих D. repens собак у 84 (15,6%) тварин не відмічено ніяких клінічних ознак захворювання, лише за допомогою мікроскопічних досліджень периферичної крові вдавалося виявити мікрофіляремію.

На основі власних спостережень ми виділили 4 основні форми дирофіляріозу, який спостерігався у спонтанно інвазованих D. repens собак Київського регіону: інтоксикаційна, шкірна, форма псевдопухлинних розростань та форма кардіо-гепато-ренальної недостатності.

***Інтоксикаційну форму*** відмічали в 36 тварин. Захворювання характеризувалось неспецифічними або стертими клінічними ознаками. Тварини швидко втомлюються, у них знижується, а іноді і спотворюється апетит, спостерігається загальне виснаження і апатія, кашель, утруднене дихання, іноді підвищення температури тіла до 40°С, відмічаються симптоми порушення нервової системи (тремтіння кінцівок, парези, паралічі).

**Таблиця 1**

###### Результати досліджень собак на дирофіляріоз протягом 2000-2002 рр.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Рік | Досліджено собак | Виявлена мікрофіляремія | | |
| всього тварин | із симптомами хвороби | безсимптомний перебіг |
| 2000 | 389 | 44 (11,3 %) | 35 (79,5 %) | 9 (20,5 %) |
| 2001 | 914 | 183 (20 %) | 156 (85,2 %) | 27 (14,8 %) |
| 2002 | 1354 | 313 (23,1 %) | 265 (84,7 %) | 48 (15,3 %) |
| Всього: | 2657 | 540 (20,3 %) | 456 (84,4 %) | 84 (15,6 %) |

***Шкірна форма*** виявлена в 49 тварин. Основним симптомом було ураження шкіри голови, спини та кінцівок (міжфаланговий простір). Спочатку з’являються ділянки облисіння, потім почервоніння та припухлість, чисельні пустули і папули із серозним та гнійним вмістом, пізніше – виразки.

***Форма псевдопухлинних розростань****.* У 17 собак були виявлені пухлиноподібні розростання тканин: у міжфаланговому просторі (2), нижній третині передньої кінцівки (3), у привушних лімфатичних вузлах (2), на слизовій оболонці ясен (1), у параанальних залозах (1), у ділянці молочної залози (5) та шкіри спини (2), у ділянці грудної клітки (1).

При цитологічному дослідженні в кожному випадку картина була по-своєму специфічна. Однак, відмічені деякі спільні ознаки: в мазках переважали лімфоцити і плазматичні клітини; була відсутня інфільтрація нейтрофілами, яка характерна при дослідженні вмістимого пустул чи мазків-відбитків виразкової поверхні шкіри. Експансія еозинофілами не була характерною, але в двох випадках у субстраті псевдопухлини були виявлені тільки тучні клітини різного ступеня зрілості; спостерігалася виражена реакція з боку уражених тканин у вигляді появи активованих фібробластів та інших клітин сполучнотканинного походження, епітелію з ознаками проліферації (збільшене ядро, наявність ядерець). Однак, у всіх випадках виявляли поліморфізм клітинного складу; у частини собак наявність мікрофілярій у тканині пухлини не супроводжувалась мікрофіляремією.

Виявлення мікрофілярій у пунктаті передміхурової залози дозволило нам у багатьох випадках провести диференційний діагноз простатиту та захворювань злоякісного походження. Було виявлено 6 випадків простатиту, викликаного інвазією Dirofilaria repens, опису якого ми не знайшли в доступній нам літературі.

***Форма гепато-кардіо-ренальної******недостатності.*** Із 64 досліджуваних собак з явищами асциту нами виявлено 18 (28%) собак з асцитом дирофіляріозної етіології.

При обстеженні у тварин спостерігалась загальна слабкість, задишка, анемічність слизових оболонок, тахікардія, асцит.

В асцитичній рідині у 5 із 18 собак були виявлені мікрофілярії, причому, у 2 з них одночасно спостерігалась і мікрофіляремія, а у 3 інших мікрофілярії були наявні тільки в пунктаті черевної порожнини; у 13 собак з явищами асциту спостерігалась тільки мікрофіляремія.

Цитохімічне фарбування мікрофілярій з асцитичної рідини на кислу фосфатазу дало інтенсивне червоне забарвлення всього тіла личинок з більш яскравою плямою в області анальної пори. Це не дозволило провести чітку диференціацію між D. repens та D. drancunculoides. Слід зазначити, що на момент проведення дослідження тварини отримували специфічне лікування.

Виявлені клінічні симптомокомплекси дирофіляріозу собак, на наш погляд, є наслідком ушкоджуючого впливу мікрофілярій не тільки як механічного чинника, але їх токсигенної та алергенної дії, які, очевидно, і являються основним етіопатогенетичним фактором у розвитку захворювання.

**Морфологічні зміни уражених внутрішніх органів за дирофіляріозу.** Циркулюючи тривалий час у кровоносному руслі, мікрофілярії заносяться з кровотоком у тканини внутрішніх органів і, діючи як біологічний ушкоджувальний чинник, зумовлюють розвиток там деструктивно-дистрофічних змін тканин та запальних процесів.

В наших дослідженнях найчастіше реєструвались структурні порушення тканин нирок, печінки, серця і легень.

При середньому ступені мікрофіляремії гістологічна картина нирок характеризується зернистою дистрофією епітелію звивистих канальців, наявністю в їх просвіті еозинофільних волокнистих мас, та десквамацією епітеліоцитів стінки канальців. У інтерстиційній тканині нирок спостерігається набряк, розширення та повнокрів’я кровоносних судин, наявність в окремих дрібних судинах червоних пристінкових тромбів. Капіляри судинних клубочків ниркових тілець різко гіперемійовані (повнокрів’я), спостерігається набряк в міжкапілярному просторі і вихід еритроцитів з капілярів. Відмічається проліферація ендотелію капілярів судинних клубочків ниркових тілець та мезангію, загальне збільшення та деформація ниркових тілець.

На нашу думку, розвиток інтракапілярного гломерулонефриту при наявності мікрофілярій у паренхімі нирок пов’язаний з емболією судинних клубочків ниркових тілець дрібними тромбами та личинками D. repens, з наступним розвитком дистрофічних змін епітелію ниркових канальців у вигляді зернистої дистрофії. Безперечно, в патогенезі гломерулонефриту при мікрофіляремії слід враховувати не тільки інвазійно-токсичний вплив на тканини нирок личинок паразита, але і реакцію тканин, сенсибілізованих до антигенів мікрофілярій, як прояв місцевої алергії. Збільшення кількості циркулюючих імунних комплексів при мікрофіляремії також може бути причиною ураження нирок, оскільки імунні комплекси містять активований фрагмент С3-компонента комплементу, а епітеліальні і мезангіальні клітини судинних клубочків ниркових тілець мають рецептори для С3-компонента комплементу.

Гістологічна картина печінки за мікрофіляремії характеризується вираженим набряком просторів Діссе, гідропічною та дрібно-середньокраплинною жировою дистрофією гепатоцитів, множинними вогнищевими некрозами у печінкових часточках та розростанням в них сполучної тканини. Спостерігається порушення балкової структури печінки, поява фібринозного ексудату в інтерстиції, виявляються дистрофічні зміни епітелію міжчасточкових жовчних протоків, десквамація його в просвіт протоків. Відмічаються геморагічні явища в печінці – крововиливи та геморагічна інфільтрація.

Розвиток дистрофічних змін та венозного повнокрів’я печінки на фоні тривалої мікрофіляремії, на наш погляд, зумовлені реакцією органа на інвазійно-токсичний вплив мікрофілярій. У виникненні токсичної дистрофії печінки суттєва роль, очевидно, належить також підвищеній чутливості органа при тривалому контакті з антигенами личинок дирофілярій. При порушенні бар’єрної функції печінки (імуносупресивний стан при високому ступені мікрофіляремії призводить до зниження інактивуючої здатності системи мононуклеарних фагоцитів, більшість яких локалізується у печінці) цей фактор може сприяти подальшому розвитку патологічного процесу.

При гістологічному дослідженні серця спостерігали інтерстиційний набряк фіброзної тканини серцевого клапана, на поверхні клапанів – наявність незначних фібринозних нашарувань, десквамацію ендотелію. Крім того, на поверхні ендокарду виявляли еритроцити, поодинокі або розміщені невеличкими скупченнями мононуклеарні елементи – лімфоцити, плазмоцити, що свідчить про ознаки низькоактивного запального процесу.

В міокарді відмічали виражений інтерстиційний набряк, дистрофічні зміни кардіоміоцитів (зникнення чіткої посмугованості, фрагментація волокон, деформація ядер) та виражену стромальну жирову дистрофію.

Порушення гістологічної будови тканин свідчить про те, що в ендокарді розвивається низькоактивний фібринозний ендокардит, в міокарді – дистрофічні зміни.

У легенях спостерігається розвиток запально-дистрофічних процесів у вигляді дистелектазів альвеол (нерівномірне розширення: емфізематоз окремих альвеол та спадання інших, розташованих поруч), потоншення та розриви міжальвеолярних перетинок, венозне повнокрів’я.

Епітелій дрібних бронхів та бронхіол місцями десквамований у просвіт разом з лімфоцитами, які інфільтрують внутрішню поверхню слизової оболонки бронхів. Ззовні стінка дрібних бронхів також інфільтрована лімфоцитами в незначній кількості. Міжальвеолярний простір набряклий, у деяких ділянках відмічається незначний фіброз та еритроцитарно-лімфоцитарна інфільтрація. Виявлені нами гістологічні зміни в легенях подібні до таких, що розвиваються внаслідок тривалого перебігу тропічної легеневої еозинофілії (рідкісний прояв філяріатозів) і проявляються у вигляді інтерстиційного фіброзу без тканинної еозинофілії.

Таким чином, гістологічні зміни в тканинах свідчать про розвиток запальних і дистрофічних процесів з порушеннями реологічних властивостей крові та живлення тканин. Слід відмітити також реакцію тканин, сенсибілізованих до антигенів мікрофілярій, і розвиток місцевих алергічних процесів.

Зміна гематологічних показників. **У спонтанно інвазованих дирофіляріями собак з низьким ступенем мікрофіляремії достовірних змін кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну, порівняно з контрольною групою тварин, не відмічали (табл.2.), але спостерігали достовірний лейкоцитоз: середня кількість лейкоцитів складала 14,4±1,39 проти 9,1±0,46 Т/л у контрольної групи собак (Р< 0,01). На нашу думку, цей лейкоцитоз пов’язаний із розвитком запальних реакцій у відповідь на інвазію дирофілярій.**

**У тварин з високим ступенем мікрофіляремії відмічали достовірне зменшення кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну, відповідно до 5,34±0,43 (Р< 0,01) та 98,14±8,74 (Р< 0,01) проти контрольної групи собак.**

**Відмічались певні зміни і в лейкоцитарній формулі інвазованих дирофіляріями тварин. Так, у собак із сильним і слабким ступенями мікрофіляремії відмічено достовірне збільшення відносної кількості еозинофілів відповідно в 2 та 5 разів у порівняні з контрольною групою.**

Таблиця 2

Гематологічні показники, М±m, n=21

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Групи тварин | Еритроцити,  Т/л | Гемоглобін,  Г/л | Лейкоцити,  Г/л |
| низький ступінь мікрофіляремії | 6,28±0,15 | 114,23±5,65 | 14,4±1,39\*\* |
| високий ступінь мікрофіляремії | 5,34±0,43\* | 98,14±8,74\* | 8,1±0,56 |
| контроль | 6,21±0,21 | 123,00±3,2 | 9,1±0,46 |

\* - Р<0,05, \*\*- Р< 0,01 порівняно з контрольною групою.

У собак з низьким ступенем мікрофіляремії відмічали значну еозинофілію 14,4±3,74% (Р<0,05) при одночасному лейкоцитозі - 14,4±1,39 г/л Р< 0,01 і лімфоцитозі - 4,02±0,5 г/л (Р< 0,01), у порівняні з контрольною групою тварин. Біологічна доцільність еозинофілії полягає у цитотоксичному впливі пероксидази, звільненої безпосередньо із вакуолей еозинофілів, на покриту антитілами личинку гельмінта і руйнуванні її поверхневого шару.

У крові собак з високим ступенем мікрофіляремії спостерігали незначне збільшення відносної кількості еозинофілів - 6,29±1,24% (Р<0,05) при нормальному вмісті лейкоцитів (8,1±0,56 Г/л) і лімфопенію - 1,42±0,16 Г/л (Р<0,01) у порівняні з контрольною групою тварин.

Крім еозинофілії, у собак з мікрофіляремією виявляли ознаки активації моноцитів та кров’яних пластинок, які проявлялись у вигляді гігантських кров’яних пластинок, що утворювали великі скупчення та розеткоподібні структури з моноцитами і лімфоцитами.

Отже, активізацію захисних механізмів на вплив інвазійного чинника у вигляді лейкоцитозу, а також еозинофілії, лімфоцитозу з ознаками активації моноцитів та тромбоцитів спостерігали в собак із низьким ступенем мікрофіляремії, тоді як у тварин із високим ступенем мікрофіляремії виявляли достовірне зменшення кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну, незначну еозинофілію і лімфопенію при нормальному вмісті лейкоцитів, що свідчить про розвиток анемії та послаблення імунної відповіді організму собак на інвазію.

**Зміни імунологічного статусу за дирофіляріозу собак.** У собак з низьким ступенем мікрофіляремії при достовірному збільшенні відносної та абсолютної кількості Т-лімфоцитів відповідно в 1,1 (Р<0,05) і 1,9 рази (Р<0,01) виявляли достовірне збільшення відносної кількості еозинофілів у 4,9 рази (Р<0,01), порівняно з контрольною групою тварин.

У групі тварин з високим ступенем мікрофіляремії при достовірному зменшенні відносної і абсолютної кількості Т-лімфоцитів, відповідно у 1,2 (Р<0,05) і 2 рази (Р<0,001), порівняно з контрольною групою тварин спостерігали достовірне збільшення кількості еозинофілів у 2,2 рази (Р<0,05) порівняно з контрольною групою собак. Очевидно, незначна еозинофілія при одночасному пригніченні клітинного імунітету носить захисний характер, так як попереджує розвиток небажаних для організму надмірних імунних реакцій, які б могли призвести до ушкодження власних тканин.

Достовірне збільшення відносного і абсолютного числа Т-лімфоцитів на 4,7% (Р<0,05) і 0,87 Г/л (Р<0,01) відповідно та абсолютної кількості В-лімфоцитів на 0,34 Г/л (Р< 0,001) у собак з низьким ступенем мікрофіляремії, порівняно з контрольною групою тварин, свідчить про активізацію клітинного і гуморального імунітету (табл.3).

Це підтверджується субпопуляційним складом Т-лімфоцитів собак цієї групи: достовірне збільшення відносної й абсолютної кількості Т-хелперів та абсолютної кількості Т-активаторів на 4,6% (Р<0,05) і 0,72 Г/л (Р<0,01) та 0,11 Г/л (Р<0,05) відповідно в порівняні з контрольною групою тварин.

У собак з високим ступенем мікрофіляремії відмічається достовірне зниження відносного і абсолютного числа Т-лімфоцитів на 7% (Р<0,05) і 0,46 Г/л (Р< 0,001) відповідно та зниження відносного і абсолютного числа В-лімфоцитів на 3% (Р<0,05) і 0,18 Г/л (Р< 0,001) відповідно в порівняні з контрольною групою тварин.

Одночасно спостерігалося достовірне збільшення відносної кількості О-лімфоцитів на 10% (Р<0,05) у порівняні з контрольною групою тварин, тобто відбувається переважання малоактивної у функціональному відношенні популяції лімфоцитів.

Таким чином, одержані результати свідчать про те, що у собак з високим ступенем мікрофіляремії розвивається імуносупресивний стан клітинного і гуморального імунітету.

При дослідженні субпопуляційного складу Т-лімфоцитів у собак з високим ступенем мікрофіляремії відмічено достовірне зниження відносної і абсолютної кількості Т-хелперів та Т-активаторів на 9,9% (Р<0,01) і 0,5 Г/л (Р< 0,001) та 2,4% (Р<0,05) і 0,08 Г/л (Р<0,05) відповідно, при одночасному підвищенні відносної і абсолютної кількості Т-супресорів на 2,9% (Р<0,05) і 0,8 Г/л (Р<0,05) відповідно в порівняні з контрольною групою тварин.

Спостерігалося зниження імунорегуляторного індексу (Тх/Тс) на 47,7% (Р< 0,001), а також зниження фагоцитарної активності (ФА) і фагоцитарного індексу (Фİ) у собак з високим ступенем мікрофіляремії, відповідно на 11,9% (Р<0,05) і 11,4% (Р<0,05) в порівняні з контрольною групою тварин.

У крові собак з високим і низьким ступенем мікрофіляремії відмічали достовірне збільшення вмісту циркулюючих імунних комплексів, порівняно з контрольною групою, відповідно в 2,6 і 1,4 рази. Так, у групах собак з високим і низьким ступенем мікрофіляремії загальна кількість імунних комплексів становила відповідно 112,07±14,7 од. (Р<0,001) і 60,39±3,79 од. (Р<0,05).

Відомо, що циркулюючі імунні комплекси можуть пригнічувати імунну відповідь організму завдяки зниженню антитілоутворюючої функції В-клітин, вибірковому пригніченню активності Т-хелперів і активації Т- супресорів (Даугалиева Э.Х., Филиппов В.В., 1991).

Таблиця 3

Співвідношення кількості різних популяцій лімфоцитів, М±m, n=21

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Групи тварин | Лімфоцити | | Т-лімфоцити | | В-лімфоцити | | О-лімфоцити | |
| % | Г/л | % | Г/л | % | Г/л | % | Г/л |
| І | 27,86  ±1,61 | 4,02  ±0,5\*\* | 46,57  ±1,09\* | 1,81  ±0,23\*\* | 17,29  ±0,78 | 0,71  ±0,07\*\*\* | 36,14  ±0,87\* | 1,49  ±0,2 |
| ІІ | 17,71  ±2,11\* | 1,42  ±0,16\*\* | 34,86  ±2,52\* | 0,48  ±0,05\*\*\* | 13,71  ±1,24\* | 0,19  ±0,02\*\*\* | 51,43  ±3,46\* | 0,74  ±0,12 |
| ІІІ | 24,71  ±1,39 | 2,24  ±0,15 | 41,86  ±1,3 | 0,94  ±0,05 | 16,71  ±0,48 | 0,37  ±0,03 | 41,43  ±1,54 | 1,07  ±0,12 |

\* - Р<0,05, \*\*- Р< 0,01, \*\*\* - Р< 0,001 порівняно з контрольною групою.

**Зміна біохімічних показників крові собак при дирофіляріозі** у спонтанно інвазованих дирофіляріями собак з мікрофіляремією свідчить про наявність функціональних порушень у діяльності печінки та нирок. Так, у собак з низьким ступенем мікрофіляремії спостерігали субклінічне враження печінки – достовірне збільшення вмісту білірубіну до 2,43±0,5 ммоль/л (Р<0,05) та активності АлАТ до 0,63±0,08 мкм/год мл (Р<0,05) у порівнянні з тваринами контрольної групи. Коефіцієнт де Рітіса (АсАт/АлАт) становить 1,19.

У собак з високим ступенем мікрофіляремії спостерігали значні зміни показників функціонального стану печінки. Достовірне збільшення вмісту загального білірубіну в крові собак другої групи в 4 рази, підвищення активності трансаміназ - АсАТ в 1,9 раз та АлАТ в 3,12 рази, а також зниження вмісту загального білка до 55,43 г/л (Р< 0,001) і глюкози до 4,41 ммоль/л (Р< 0,05) порівняно з контрольною групою тварин свідчить про розвиток функціональної недостатності печінки. Коефіцієнт де Рітіса становить 0,8.

У собак з високим ступенем мікрофіляремії відмічали функціональні порушення видільної і фільтраційної функції нирок, на що вказує достовірне збільшення вмісту сечовини і азоту сечовини в 3,1 рази (Р<0,01), креатиніну в 1,6 рази (Р<0,05), порівняно з контрольною групою.

**ПЛР-діагностика дирофіляріозу собак.** Для ідентифікації D. repens ми використовували ген 16 S РНК. Оскільки гени 16 S РНК D. repens і D. immitis відрізняються між собою, ми підібрали праймери саме на ті ділянки гена, в яких локалізуються ці відмінності. Такі видоспецифічні праймери дають фрагменти тільки для свого виду збудника. Ампліфікації при використанні праймерів до D. immitis не спостерігали. У контрольних тварин ПЛР-реакція була відсутня при використанні праймерів обох видів.

Чутливість методу була достатньо високою: позитивна реакція була виявлена і при детекції ДНК, виділеної із зразків з присутністю 1, 5 і 10 мікрофілярій.

**Результати експериментального зараження кровосисних комарів личинками нематоди Dirofilaria repens.** Мікрофілярії D. repens виявляли в шлунку і кишечнику самок комарів до третьої доби після кровоссання (початок експерименту), причому на третю добу мікрофілярії були живими і рухливими в шлунку і кишечнику A. maculipennis і Ae. aegypti. У комарів C. pipiens у згустку крові в шлунку знаходилися загиблі мікрофілярії.

На четверту-п’яту доби в мальпігієвих судинах комарів локалізувались личинки першої стадії ("sausage stage"). Ці личинки мали характерну для даної стадії будову: відносно коротке і потовщене тіло, тонкий термінальний кутикулярний шип на хвостовому кінці, "анальну кришечку". На цій стадії інтенсивність інвазії комарів личинками була 1 – 7 (19) екземплярів.

Личинки другої стадії виявляли в мальпігієвих судинах комарів на шосту-восьму доби експерименту. Від личинок попередньої стадії ці личинки відрізнялися більш витягнутою формою тіла і більшою рухливістю. Дана стадія була відносно короткочасною, і тому при розтині комарів личинки виявлялись рідко.

Починаючи з 10 доби у мальпігієвих судинах локалізувались личинки третьої стадії. Ці личинки відрізнялись від попередньої стадії більшими розмірами тіла і більш коротким термінальним хвостовим шипом.

На 13-14 доби експерименту інвазійні личинки проникали в порожнину тіла і ротові органи комарів. У хоботку спостерігали не більше 7-9 личинок одночасно. Інвазійні личинки зберігали життєздатність у ротових органах комарів не менше 15 діб. Личинки активно залишали хоботок комара при нагріванні на тимчасових препаратах.

Проведені експерименти підтвердили здатність An. m. atroparvus Mg.і C. р. mоlestus F. слугувати проміжними живителями нематоди D. repens в умовах України. Виходячи з результатів, можна припустити, що An. m. atroparvus Mg. у порівнянні з C. р. mоlestus F. є більш придатним для розвитку личинок D. repens.

**Корекція патологічних змін при дирофіляріозі собак.** Поєднання мікрофілярицидної терапії з корекцією порушених функцій хворого організму собак комплексними гомеопатичними препаратами призводить до швидшого згасання запальних реакцій в організмі. Однак, статевозрілі гельмінти виживають. Після завершення мікрофілярицидної дії препарата в крові знову виявляються мікрофілярії. Тільки поєднане застосування макро- та мікрофілярицидних препаратів зумовлює повне звільнення організму собаки від дирофілярій.

ВИСНОВКИ

1. В клініко-експериментальних дослідженнях вивченні основні структурно-функціональні зміни в різних органах і тканинах собак, які виникають внаслідок ушкоджуючої дії збудника дирофіляріозу на організм тварин, а також прояви захисно-компенсаторних реакцій на такі ушкодження; проведена оцінка різних методів діагностики інвазії та запропонований новий вітчизняний діагностикум; виявлені потенційні проміжні живителі дирофіляріозу в умовах Українського Полісся; запропоновано комбінований спосіб корекції змін в організмі за дирофіляріозу.
2. Тривала циркуляція мікрофілярій у кровоносному руслі зумовлює розвиток дистрофічних змін тканин різних органів. У патогенезі ураження нирок, печінки, серця при мікрофіляремії провідним патогенетичним фактором слід вважати інвазійно-токсичну дію на тканини личинок паразита, а також реакцію тканин, сенсибілізованих до антигенів мікрофілярій як прояв місцевої алергії.
3. У спонтанно інвазованих дирофіляріями собак з мікрофіляремією відмічаються функціональні порушення діяльності печінки та нирок, які виникають, очевидно, на фоні тривалої мікрофіляремії внаслідок пригнічення клітинного і гуморального імунітету.
4. У собак з високим ступенем мікрофіляремії спостерігали розвиток анемії, про що свідчить достовірне зменшення кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну, відповідно до 5,34±0,43 Т/л (Р< 0,01) і 98,14±8,74 (Р< 0,01) проти контрольної групи собак.
5. У собак з низьким ступенем мікрофіляремії відмічали значну еозинофілію 14,4±3,74% (Р<0,05) при одночасному лейкоцитозі - 14,4±1,39 г/л Р< 0,01 і лімфоцитозі 4,02±0,5 г/л (Р< 0,01) в порівняні з контрольною групою тварин, а також ознаки активації моноцитів та тромбоцитів, що свідчить про активізацію захисних механізмів у відповідь на інвазію.
6. У групі тварин з низьким ступенем мікрофіляремії спостерігали активізацію клітинного і гуморального імунітету, направленого на знищення або створення несприятливих умов для виживання інвазійного чинника. В організмі собак з високим ступенем мікрофіляремії спостерігали стан імунологічної супресії.
7. На основі морфологічних особливостей будови статевозрілих дирофілярій від собак та специфічного фарбування мікрофілярій з периферичної крові на кислу фосфатазу дозволили встановити вид гельмінту - Dirofilaria repens.
8. Одержано позитивні результати діагностики дирофіляріозу в Україні за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Чутливість методу достатньо висока: позитивна реакція виявлена при детекції ДНК, виділеної із зразків з присутністю 1, 5 і 10 мікрофілярій.
9. Проведений моніторинг щодо розповсюдження дирофіляріозу показав, що за останні роки відмічено збільшення кількості собак, хворих на дирофіляріоз. Екстенсивність інвазії дирофіляріозу серед бездомних собак м. Києва становить 30%, а серед домашніх – 22%. Найвища інтенсивність інвазії (>100 мф/мл) реєструвалась переважно в собак віком 6,5±2,4 роки.
10. За характером клінічних проявів виділено чотири основні клінічні форми дирофіляріозу: інтоксикаційна, шкірна, псевдопухлинних розростань та форма кардіо-гепато-ренальної недостатності.
11. Експериментально підтверджена здатність комарів видів Culex pipiens mоlestus F., Anopheles maculipennis atroparvus Mg. і Aedes aegypti L. слугувати проміжними хазяями нематоди D. repens. Виходячи з результатів, можна припустити, що An. m. atroparvus Mg. у порівнянні з C. р. mоlestus F. є більш придатним для розвитку личинок D. repens в умовах України.
12. Застосування макро-та мікрофілярицидних препаратів зумовлює повне звільнення організму собаки від дирофілярій. Поєднання мікрофілярицидної терапії з комплексними гомеопатичними препаратами призводить до швидшого згасання запальних реакцій в організмі собак.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Розкриті нові клініко-патогенетичні особливості перебігу інвазії D. repens у собак та результати корекції патологічних змін за дирофіляріозу можуть бути використані як у навчально–науковому процесі, так і в практичній ветеринарній медицині.
2. Випробувана система праймерів для ПЛР-діагностики може бути застосована у ветеринарній практиці для верифікації виду гельмінта і моніторингу ефективності проведеного лікування, а при низькій мікрофіляремії – для діагностики дирофіляріозу. При проведенні епідеміологічних досліджень з її допомогою можна виявляти ДНК личинок дирофілярій в проміжному живителі, що важливо для виявлення територій, потенційно небезпечних для поширення гельмінтозу.
3. Морфологічні дослідження дирофілярій і визначення їх видової приналежності на території України, а також результати експериментальних досліджень по зараженню комарів мікрофіляріями можуть використовуватись паразитологами, ветеринарними спеціалістами та працівниками санітарно-епідеміологічних станцій з метою подальшого вивчення цього гельмінтозу і прогнозування епізоотологічної та епідеміологічної ситуації поширення дирофіляріозу і розробленні ефективних методів захисту тварин і людей від небезпечного антропозоонозу.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ**

1. Величко С.В., Носата Н.С. (Василик Н.С.), Абраменко І.В., Білоус Н.І. Визначення видової належності гельмінта та клініко-патогенетичні особливості інвазії Dirofilaria repens у собак в північних районах України // Науковий вісник НАУ.−2000.− №28. − С. 167-172.

(Дисертант відібрала проби крові у собак і провела гельмінтоларвоскопічні дослідження).

1. Мазуркевич А.Й., Величко С.В., Василик Н.С., Юревич О.В., Абраменко І.В., Білоус Н.І. Дирофіляріоз собак у Київському регіоні: клінічна картина // Ветеринарна медицина України. −2001. − №3. − С. 18-19.

(Дисертант провела загальноклінічні і гематологічні дослідження).

1. Василик Н.С. Деякі аспекти епізоотології та клінічного прояву інвазії Dirofilaria repens у собак Київського регіону // Науковий вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького. − 2001. − Т 3 (№1). − С. 77-82.
2. Мазуркевич А.Й., Величко С.В., Василик Н.С., Місюрін А.В., Абраменко І.В. До діагностики дирофіляріозу собак в Україні // Науковий вісник НАУ. − 2001. − № 42. − С. 16-20.

(Дисертант відібрала проби крові у собак, провела цитохімічне фарбування мікрофілярій на кислу фосфатазу і підготувала матеріал для ПЛР-діагностики).

1. Мазуркевич А.Й., Величко С.В., Василик Н.С., Юревич О.В., Абраменко І.В., Білоус Н.І.Простатит собак дирофіляріозної етіології // Ветеринарна медицина України.− 2002.– № 11.– С. 32–34.

(Дисертант провела загальноклінічні дослідження і видоспецифічне фарбування мікрофілярій).

1. Мазуркевич А. Й., Величко С. В., Василик Н. С. Застосування стронгхолду як мікрофілярициду при інвазії Dirofilaria repens у собак // Науковий вісник Львівської державної академії ветеринарної медицини ім. С.З. Гжицького. − 2002. − Т.4. (№2). − Ч.1.– С.100-104.

(Дисертант провела гельмінтоларвоскопічні дослідження собак і визначила ефективність стронхолду за дирофіляріозу собак).

1. Мазуркевич А.Й., Василик Н.С, Абраменко І.В. Мікрофілярії як важливий патогенетичний чинник при інвазії собак Dirofilaria repens // Вісник Аграрної академії наук України.− 2002.− №9.− С. 33−35.

(Дисертант відібрала проби крові у собак і провела гематологічні та цитологічні дослідження).

1. Мазуркевич А.Й., Василик Н.С. Дирофіляріоз, як небезпечний антропозооноз в Україні // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник.− Харків. −2003.− №82.− С. 366−368.

(Дисертант провела гельмінтоларвоскопічні дослідження та видоспецифічне фарбування мікрофілярій на кислу фосфатазу).

1. Мазуркевич А.Й., Василик Н.С., Авраменко Т.О., Величко С.В., Вароді Е.І., Тарелло В. Перший випадок виявлення статевозрілих Dirofilaria repens при кастрації кота // Матеріали ІІ-ї міжнародної науково-практичної конференції з проблем дрібних тварин, 28-30 травня 2003 р., м. Одеса. − 2003. − С. 72-73.
2. Мазуркевич А.Й., Василик Н.С. Гематологічні та клініко-біохімічні зміни в організмі собак при дирофіляріозі // Тези доповідей наукової конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників та аспірантів НАУ. − 2001. − С. 79.
3. Мазуркевич А.Й., Василик Н.С. Дирофіляріоз собак в Україні. Тези доповідей наукової конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників та аспірантів НАУ. − 2002. − С. 53.
4. Мазуркевич А.Й., Василик Н.С. Мікрофіляремія при дирофіляріозі собак. Тези доповідей наукової конференції професорсько-викладацького складу, наукових співробітників та аспірантів НАУ. − 2003. – С. 46.
5. Василик Н.С., Вароді Е.І., Кузьмін Ю.І., Кононко Г.Г., Важеніна І.І. Експериментальне зараження кровосисних комарів личинками нематоди D. repens // Матеріали VIII-ої міжнародної науково-практичної конференції “Проблеми ветеринарного обслуговування дрібних домашніх тварин”, 16-17 жовтня 2003 р., м. Київ. – С. 137-138.

**Василик Н.С. Морфофункціональні зміни та адаптаційно-компенсаторні реакції в організмі собак за дирофіляріозу. — Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.02 - патологія, онкологія і морфологія тварин. — Національний аграрний університет, Київ, 2004.

Дисертаційна робота присвячена вивченню рівня структурних та функціональних порушень органів і систем, як наслідку патологічних змін та формування адаптаційно-компенсаторних реакцій в організмі собак у відповідь на ушкоджуючу дію збудника дирофіляріозу, а також дослідженню біологічних особливостей Dirofilaria repens у спонтанно інвазованих тварин і корекції змін в організмі при дирофіляріозі.

При виконанні роботи використані гематологічні, біохімічні, імунологічні, цитогістологічні, біотехнологічні, гельмінтоларвоскопічні, гельмінтоскопічні і статистичні методики досліджень.

Виявлена залежність характеру перебігу патологічного процесу при інвазії D. repens від інтенсивності інвазії мікрофіляріями. Тривала мікрофіляремія зумовлює зміну морфології клітин крові, порушення обміну речовин, розвиток деструктивно-дистрофічних процесів у паренхіматозних органах, виникнення імунологічних реакцій.

За клінічним проявом виділено чотири основні форми дирофіляріозу: інтоксикаційна, шкірна, форма псевдопухлинних розростань, форма кардіо-гепато-ренальної недостатності.

Виявлена висока чутливість синтезованих праймерів для ПЛР-діагностики дирофіляріозу: позитивна реакція спостерігалася при детекції ДНК, виділеної із зразків з присутністю 1, 5 і 10 мікрофілярій.

Проведене експериментальне зараження личинками *D. repens* самок комарів *A. m.* *аtroparvus, Ae. aegypti* і *C. p. molestus.* Характер розвитку личинок в експерименті свідчить про можливу участь *A. m.* а*troparvus* і *C. p. molestus* у циркуляції паразита в умовах Українського Полісся.

Запропонована схема поєднаного застосування макро-та мікрофілярицидних препаратів, яка зумовлює повне звільнення організму собаки від дирофілярій.

*Ключові слова:* собака, дирофіляріоз, D. repens, мікрофілярія, мікрофіляремія, кисла фосфатаза, A. m. atroparvus, C. p. molestus, Ae. aegypti L., ПЛР – діагностика, мікро-і макрофілярициди.

**Василик Н.С. Морфофункциональные изменения и адаптационно-компенсаторные реакции в организме собак при дирофиляриозе. — Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.02 - патология, онкология и морфология животных. - Национальный аграрный университет, Киев, 2004.

Диссертационная работа посвящена изучению уровня функциональных повреждений органов и систем как следствия патологических изменений и формирования адаптационно-компенсаторных реакций в организме собак в ответ на повреждающее воздействие возбудителя дирофиляриоза, а также исследованию биологических особенностей Dirofilaria repens у спонтанно инвазированых животных и корекции изменений в организме при дирофиляриозе.

При выполнении работы использованы гематологические, биохимические, иммунологические, цитогистологические, биотехнологические, гельминто-ларвоскопические, гельминтоскопические и статистические методы исследований.

Определена зависимость характера протекания патологического процесса при инвазии D. repens от количества имеющихся в организме инвазионных элементов. Длительная микрофиляремия приводит к изменению морфологии клеток крови, нарушению обмена веществ, развитию деструктивно-дистрофических процессов в паренхиматозных органах, возникновению иммунологических реакций.

Выявлено, что интенсивность инвазии (ИИ) микрофиляриями зависит от возраста собак. Так, наивысшую ИИ регистрировали у собак в возрасте 6,5±2,4 года. Таким образом, ежегодная реинвазия собак микрофиляриями приводит к увеличению ИИ половозрелыми дирофилярими, и, соответственно, в последующие годы в крови регистрировали большее количество личинок.

Экстенсивность инвазии (ЭИ) дирофиляриоза среди бездомных собак г. Киева составляет 30%. По данным Печерской районной в г. Киеве государственной больницы ветеринарной медицины ЭИ дирофиляриоза среди домашних собак на протяжении 2000-2002 годов составляла 22%.

При цитохимическом исследовании микрофилярий из мазков периферической крови и пунктатов пораженной кожи установлено, что во всех случаях их тело имеет характерное яркое пятно активности тартрат-резистентной кислой фосфатазы в области анальной поры. Такая цитохимическая характеристика является типичной для дирофилярий вида D. repens (Schrey C.F., Trautvetter E., 1998).

За клиническим проявлением выделено четыре основные формы дирофиляриоза: интоксикационная, кожная, форма псевдоопухолевых разрастаний, форма кардио-гепато-ренальной недостаточности.

Развитие анемии наблюдали у животных с высоким уровнем микрофиляремии, что, наверное, связано с повреждающим влиянием микрофилярий и их секреторно-экскреторных веществ на систему крови.

У собак с низким уровнем микрофиляремии отмечали значительную эозинофилию 14,4±3,74% (Р<0,05) при одновременном лейкоцитозе - 14,4±1,39 г/л Р< 0,01 и лимфоцитозе 4,02±0,5 г/л (Р< 0,01) в сравнении с контрольной группой животных, что свидетельствует об активизации защитных механизмов в ответ на инвазию.

У спонтанно инвазированых дирофиляриями собак с микрофиляремией отмечали изменения биохимических показателей, свидетельствующие о функциональных нарушениях печени и почек (повышение уровня билирубина, мочевины и азота мочевины, креатинина, повышение активности АлАТ, АсАТ, понижение уровня общего белка, глюкозы).

В группе животных с низким уровнем микрофиляремии отмечали активизацию клеточного и гуморального иммунитета, который направлен на создание неблагоприятных условий для выживания инвазионного агента или его уничтожение.

В организме собак с высоким уровнем микрофиляремии наблюдали состояние иммунологической супресии. У крови собак с микрофиляремией отмечали увеличение количества циркулирующих иммунных комплексов. Таким образом, длительное паразитирование значительного количества дирофилярий в организме собак создает с одной стороны недостаточную эффективность иммунного ответа, при котором нематоды могут избегать иммуноконтролирующих механизмов, а с другой стороны паразиты могут вызывать в хозяев состояние иммунологической толерантности.

Определена высокая чувствительность синтезированных праймеров для ПЦР-диагностики дирофиляриоза: положительная реакция наблюдалась при дэтекции ДНК, выделенной из образцов с присутствием 1, 5 и 10 микрофилярий.

Экспериментальное заражение и развитие личинок *D. repens* в самках комаров *A. m.* *atroparvus, Ae. aegypti* и *C. p. molestus* свидетельствуют о возможном участии *A. m.* *atroparvus* и *C. p. molestus* в циркуляции паразита в условиях Украинского Полесья.

Предложено совместное использование макро-и микрофилярицидных препаратов, которое приводит к полному освобождению организма собаки от дирофилярий.

*Ключевые слова:* собака, дирофиляриоз, D. repens, микрофилярия, микрофиляремия, кислая фосфатаза, A. m. atroparvus, C. p. molestus, Ae. aegypti L., ПЦР – диагностика, микро-и макрофилярициды.

**Vasylyk N.S. Morphological and functional changes and adaptation and compensatory reaction in dogs’ organism at dirofilariosis. – Manuscript.**

Dissertation presented for scientific degree of candidate of science on specialty 16.00.02 – Pathology, oncology and morphology of animals – National Agrarian University, Kiev, 2004.

Dissertation is devoted to the research of the level of structural and functional disorders of organs and systems as consequence of pathological changes and adaptation and compensation reactions in dogs’ organism as respond injure action of dirofilariosis and study of biological characteristic features of Dirofilaria repens in spontaneously infected animals and correction organism changes at dirofilariosis.

The haematological, biochemical, immunological, cytohistological, biotechnological, parasitological and statistics methods are used during research. It has been determined that character of pathological process course at D. repens invasion depend on microfilaria invasion intensity. Protracted microfilaremia causes changes of blood cells morphology, metabolic disorders, development of destructive and dystrophycal processes in parenchimatous organs, immunological reactions.

Based on clinical signs four main forms of dirofilariosis: intoxication, skin, pseudotumor form, cardio-liver-kidney insufficiency were defined.

High sensitivity of synthesized primers for PCR-diagnostics of dirofilariosis was determined: positive reaction is observed at DNA detection isolated from samples that contained 1,5 and 10 microfilarias.

Experimental contamination of female mosquitos A. m. atroparvus, Ae. aegypti and C. p. molestus by D. repens was carried out. The type of development in experiments gives evidence of possible participation of A. m. atroparvus and C. p. molestus in parasite circulation in ukrainian Polissya condition.

Th scheme of combined application of macro- and microfilariacidal medicines are suggested that cause dirofilaria-free organism of dog.

Key words: dog, dirofilariosis, D. repens, microfilaria, microfilaremia, acid phosphatase, A. m. atroparvus, C. p. molestus, Ae. aegypti L., PCR-diagnostics, micro- macrofilariacids.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>