

В.М. Ракова,
к.м.н., младший научный сотрудник Института
медицинской паразитологии и тропической медицины
им. Е.И. Марциновского Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова

V.M. Rakova,
PhD, minor researcher of the Institute of medical
parasitology and tropical medicine named
after E.I. Martynovskiy of the First MSU
named after I.M. Sechenov

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ DIROFILARIA IMMITIS И DIROFILARIA REPENS ПРЯМЫМ МЕТОДОМ ПЦР В КОМАРАХ МОСКОВСКОЙ И НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

MOLECULAR STUDIES OF DIROFILARIA IMMITIS AND DIROFILARIA REPENS PROVIDED WITH THE DIRECT PCR METHOD OF MOSQUITOES RESEARCH IN MOSCOW AND NIZHNY NOVGOROD REGIONS

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Вера Михайловна Ракова, младший научный сотрудник Института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского

Адрес: 119435, г. Москва, ул. М. Пироговская, д. 20

Телефон: 8 499 246–80–49

E-mail: verafterova@mail.ru

Статья принята к печати: 10.12.2012

Аннотация. Целью исследования явилось определение степени зараженности самок трех родов кровососущих комаров (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*) в некоторых районах Московской и Нижегородской областей, в разное время теплого сезона года (с мая по сентябрь). Исследовали взрослых самок комаров, собранных в Москве и Московской и Нижегородской областях летом 2010 г. как потенциальных переносчиков *Dirofilaria immitis* и *Dirofilaria repens*. Наличие *Dirofilaria* spp. выявлялось с помощью полимеразной цепной реакции с использованием видоспецифичных праймеров для *D. immitis* и *D. repens*. Был рассчитан Минимальный Показатель Фонового Инфицирования (MFIR).

Установили, что MFIR составил от 7 проб/1554 общего числа комаров (4,5) и 30 проб (19,3) ПЦР-положительных комаров для *D. immitis* и *D. repens*, соответственно. Двойное инфицирование, как *D. immitis*, так и *D. repens* было обнаружено методом ПЦР в 4 пробах (2,6). Близость района к Москве увеличивало вероятность обнаружения *D. repens*, а в отдаленных районах наоборот, преобладала *D. immitis*. Самые высокие показатели общей зараженности комаров наблюдались в начале июня и в конце августа. Заключение, что период наиболее массового инфицирования самок комаров от больных плотоядных приходится на начало августа, а наибольшей опасности заражения здоровые люди и животные подвергаются в конце августа – начале сентября.

Annotation. The aim of the study was to determine the degree of contamination of three kinds of female mosquitoes (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*) in some areas of Moscow and Nizhny Novgorod regions at different times of the warm season of the year (from May to September). Examined adult female mosquitoes collected in the Moscow and Nizhny Novgorod region in the summer of 2010 as potential vectors of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*. The presence of *Dirofilaria* spp. was detected by polymerase chain reaction using species-specific primers for *D. immitis* and *D. repens*. The index of Minimum Field Infection Rates (MFIR) was calculated.

It was founded that the MFIR ranged from 7 prob/1554 total mosquitoes (4,5) to 30 samples (19,3) of PCR-positive mosquitoes for *D. immitis* and *D. repens*, respectively. Dual infection with a *D. immitis*, and *D. repens* was detected by PCR in 4 samples (2.6). The proximity of the area to Moscow increased the probability of detection of *D. repens* and in remote areas, on the contrary, was dominated by *D. immitis*. The highest rates of total infected mosquitoes were observed in early June and late August.

Concluded that the period of the most massive female mosquitoes infected from sick carnivores is at the beginning of August, the greatest risk of infection for healthy people and animals is in the late August – early September.

Ключевые слова: ПЦР, *D. repens*, *D. immitis*, комары, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*.

Key words. PCR, *D. repens*, *D. immitis*, mosquitoes, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*.

Род *Dirofilaria* включает в себя несколько видов, являющихся естественными паразитами собак, кошек, лисиц и других диких животных. *Dirofilaria immitis* (сердечная форма у собак) передается комарами и распространяется по всему миру в тропических, субтропических и умеренных зонах. Другой естественный вид, *D. repens*, паразитирует на плотоядных в Европе, Африке и Азии, локализуясь в подкожных тканях.

D. immitis и *D. repens* передаются большим количеством видов комаров, относящихся к широкому кругу родов, в том числе *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Anopheles*, *Armigeres* и *Mansonia* [1]. Передача этих паразитов к человеку происходит тем же путем, что и естественным хозяевам. Переносчики заглатывают микрофилярий первой стадии (MF-L1), питаясь зараженной кровью хозяина. Попадая в организм комара, микрофилярии мигрируют в мальпигиевы сосуды, где развиваются, а затем перемещаются в слюнные протоки и передаются при укусе другому хозяину [2]. *Ae. albopictus*, повсеместно встречающийся на территории России, также считается наиболее частым переносчиком *D. immitis* и *D. repens* на протяжении большей части своего ареала: Сингапур [3], Япония, Китай, и потенциальным переносчиком *D. immitis* и *D. repens* в Италии. Природные инфекции *D. immitis* были обнаружены в *Sx. tritaeniorhynchus* и *Sx. pipiens* в Японии и Италии [4]. *Sx. pipiens* является городским комаром и обнаруживается в больших количествах в городах и поселках. В Московской области комары обоих родов были собраны в том же количестве, что и встречались. Комары рода *Anopheles* собирались в местах «дневок».

До настоящего времени у жителей России было зарегистрировано свыше 8 тысяч случаев «редких» гельминтозов, заболеваемость которыми не превышает 1,0 на 100 тыс. населения страны. Дирофиляриоз в этой группе занимает второе место, и на его долю приходится $15 \pm 1,4\%$ случаев [5].

Проблема дирофиляриоза обусловлена широкой циркуляцией возбудителя в природной среде и отсутствием надлежащих мер по выявлению и дегельминтизации зараженных животных - облигатных дефинитивных хозяев (домашних собак и кошек). Одним из факторов распространения данного заболевания следует считать длительный латентный период (до 5 лет), в течение которого в крови присутствуют циркулирующие микрофилярии. Этот процесс сочетается с повсеместным расселением комаров, являющихся промежуточными хозяевами, их способностью к быстрому увеличению популяции и коротким периодом развития в них микрофилярий до личинок третьей стадии [6].

По данным Роспотребнадзора, в Москве и Московской области в 2011 г. дирофиляриоз был вы-

явлен у 16 человек. С мая 2011 г. по май 2012 г. в Институте медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского нами были исследованы 52 пробы крови пациентов как с подозрением на заражение дирофиляриозом, так и пациентов с хирургически подтвержденным диагнозом, из которых ПЦР-положительными оказались 11 человек.

В 2003 г. зарегистрировано 19 неблагополучных районов по дирофиляриозу собак, 2004 – 27, 2005 – 30, 2006 – 32, 2007 – 33. В 2008 г. дирофиляриоз собак зарегистрирован в Москве и 33 районах Московской области.

При исследовании 3371 собаки микрофилярии обнаружены у 4,0 % животных. Экстенсивность инвазии за 2003–2007 гг. составила 5,0–2,3 % [7].

Целью данного исследования являлось определение степени зараженности представителей 3-х родов комаров переносчиков *D. immitis* и *D. repens*, обитающих в различных районах Московской и Воротынского районе Нижегородской областей в разные месяцы теплого сезона года. Исследование проводилось с использованием имеющихся праймеров ПЦР для оценки *Dirofilaria* spp. инфекции среди популяций комаров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор комаров производился с последних чисел мая до первых чисел сентября в Шаховском, Волоколамском р-нах Московской области, районе Выхино-Жулебино (ЮВАО), деревне Лотошино на границе Московской и Тверской областей, в районе Капотни, в Щербинке (10 км от МКАД), а так же в Воротынском районе Нижегородской области. Больше всего комаров было собрано на добровольцах, затем с помощью световых ловушек, а так же с помощью портативных пылесосов Samsung.

Определение комаров производилось по морфологическим признакам с помощью определителя [8].

Комары были объединены как по видам и местам сбора, так и по периодам. Из-за редкой встречаемости заболевания в московском регионе комары тестировались по 10–15 особей в одной пробе. Для этого пулы измельчались в отдельной пробирке, наполненной 100 мкл физиологического раствора, и использовались в постановке ПЦР. Минимальный показатель фонового инфицирования (Minimum Field Infection Rate) вычислялся по формуле количество зараженных проб/количество комаров $\times 1000$.

Выделение ДНК проводилось с использованием комплекта для выделения ДНК «Diatom DNA Prep100 для выделения ДНК из различного биологического материала (ПЦР «Biokom») и «ДНК-сорб-А» вариант 100 для выделения ДНК из

клинического материала»; по инструкции завода-изготовителя. Из полученных проб ДНК 4 мкл использовались при постановке ПЦР.

Для постановки ПЦР на *D. repens* использовались *repens*-специфичные праймеры Forvard — 5'—CCGGTAGACCATGGCATTAT—3' и Revers — 5'—CGGTCTTGGACGTTTGGTTA—3'. [9, 10].

ПЦР-смесь амплифицировалась в 0,5 мл пробирках «Master mix» («ДНК-технология», «Биоком») содержащих ПЦР-ядро, 10 мкл ПЦР-буфера, 2 мкл каждого праймера, и 5 мкл пробы ДНК, а так же масло для ПЦР. После начальной денатурации 94°C — 5 мин, в реакции на *D. repens* были проведены 48 циклов амплификации в такой последовательности: 94°C — 30 с, 50°C — 30 с и 72°C — 1 мин, затем 72°C — 5 мин [9, 10].

D. immitis-специфичные праймеры:

— Forvard — (5'—TGATTGGTGGTTTGGTAA—3') и

— Revers — (5'—ATAAGTACGAGTATCAATATC—3').

Амплификация производилась в 0,5 мл пробирках «Master mix» («ДНК-технология», «Биоком»), содержащих ПЦР-ядро, 10 мкл ПЦР-буфера, 2 мкл каждого праймера, и 5 мкл пробы ДНК, а так же масло для ПЦР. Режим амплификации: начальная денатурация — 94°C — 30с, затем 30 циклов в такой последовательности: 94°C — 1 мин, 50°C — 2 мин, 72°C — 3 мин [9, 10].

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агаровом геле, окрашенном бромистым этидием, а затем фотографировали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Были проанализированы в общей сложности 1554 самки комаров, принадлежащих к трем родам (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*).

Чаще всего попадались представители рода *Aedes* (62%), затем *Culex* (30,6%), и *Anopheles*(7,3%).

Результаты ПЦР-анализа распространенности изучаемых паразитов в различных районах Московской и Нижегородской областей и других родов комаров представлены в табл. 1, 2.

Как можно видеть, максимальная общая зараженность по *D. repens* наблюдалась у самок всех трех родов комаров, собранных в конце августа в Шаховском (42,0), Волоколамском (130,5) районах Московской области, а также в районе Выхино-Жулебино (51,0). Близкие к ним значения зараженности, но уже по *D. immitis* получились у самок *Aedes*, собранных в Воротынском районе Нижегородской области в середине июня 2010 г. (31,0).

У 134 самок, собранных в сентябре в Шаховском районе Московской области и городе Щербинка MFIR по *D. repens* и *D. immitis* был несколько ниже, а самые низкие значения были у комаров, собранных в конце мая — начале июня и в двадцатых числах июля. Двойное инфицирование наблюдалось у самок рода *Aedes* и *Culex*.

ОБСУЖДЕНИЕ

D. immitis и *D. repens* паразитические нематоды, передающиеся комарами, относящимися к нескольким родам (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex* и пр). Фак-

Таблица 1.

Встречаемость *D. immitis* и *D. repens* в комарах в некоторых районах московского региона и Нижегородской области (2010 г.)

Районы	Всего	Месяцы														
		Май			Июнь			Июль			Август			Сентябрь		
		всего	<i>D. re-pens</i>	<i>D. im-mitis</i>	всего	<i>D. re-pens</i>	<i>D. im-mitis</i>	всего	<i>D. re-pens</i>	<i>D. im-mitis</i>	всего	<i>D. re-pens</i>	<i>D. im-mitis</i>	всего	<i>D. re-pens</i>	<i>D. im-mitis</i>
Волоколамский	44	21	0	0	0	0	0	0	0	0	23	3	0	0	0	0
Выхино	246	92	1	0	56	3	0	0	0	0	98	5	0	0	0	0
Капотня	77	0	0	0	77	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Лотошино	30	0	0	0	30	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Нижегородская обл.	258	0	0	0	258	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Шаховская	777	67	1	0	432	4	1	104	2	0	119	4	1	55	2	0
Щербинка	122	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	79	0	0
Всего	1554	223	2	0	853	12	6	104	2	0	240	12	1	134	2	0

Примечание. Самые низкие показатели инфицированности наблюдались у представителей рода *Aedes*, пойманных в середине мая — начале июня и в конце июля, а самые высокие — у представителей рода *Anopheles*, собранных в середине и конце августа.

Таблица 2.

Общая зараженность разных родов комаров паразитами (2010 г.)

Роды комаров	Количество комаров	Кол-во проб	D. repens		D. immitis		D. repens /D. immitis	
			позитивных	MFIR	позитивных	MFIR	позитивных	MFIR
Aedes spp.	964	82	17	18	6	6,2	3	3,1
Anopheles spp.	114	10	3	26,3	0	0	1	8,8
Culex spp.	476	46	10	21	1	2,1	0	0
Всего	1554	138	30	19,3	7	4,5	4	2,6

торы, влияющие на передачу *D. immitis* и *D. Repens*, включают благоприятную температуру окружающей среды, плотность и видовой состав популяции, плодовитость комаров, а также наличие резервуарных хозяев. Климатические изменения последних лет, ослабление контроля за лесными ресурсами, сокращение сельхозплощадей в сочетании с ослаблением контроля за численностью резервуарных хозяев *Dirofilaria* spp, привели к значительному увеличению случаев дирофиляриоза как среди людей, так и среди домашних и диких млекопитающих.

Московская область расположена в зоне умеренного климата, где средняя температура самого жаркого месяца составляет всего +19,2°C, а оптимальная температура для развития личинок дирофилярий +24–27°C [1], поэтому благоприятные условия для дирофилярий отмечаются лишь в теплый и влажный летний сезон [11].

Влажность районов Московской области сильно зависит от их местоположения: удаленность от мегаполиса, с одной стороны, способствует увеличению числа переносчиков, с другой стороны, способствует снижению их зараженности вследствие уменьшения плотности популяции восприимчивых животных — в основном, бездомных собак. Большое количество бродячих собак в городе, являющихся резервуаром для дирофилярий, хоть и приводит к достаточно сильному увеличению показателей зараженности комаров дирофиляриозом, но все же не превышает показатели зараженности по области, особенно возле небольших городов и деревень.

В Московской области достаточно часто встречается *D. repens*, в то время как восточнее, в Нижегородской области, повышается встречаемость *D. immitis*.

По данным Ястреба В.Б., в конце июля — начале августа у собак наблюдается пик инвазии, в то время как показатели инфицированности комаров в это время достаточно низки. В середине же августа показатели инфицированности комаров резко повышаются, в то время как показатели инвазированности собак понижаются [7]. Исходя из этого, мож-

но предположить, что период наиболее массового инфицирования самок комаров от больных собак приходится на начало августа, а наибольшей опасности заражения здоровые люди и животные подвергаются в конце августа — начале сентября.

Список литературы

1. Архипов И.А., Архипова Д.П. Дирофиляриоз. — М., 2004.
2. Chellappah W.T., Chellappah G.R. Journal of Medical Entomology. — Vol. 5. — № 3. — 1968. — P. 358–361.
3. Anyanwu I.N., Agbede R.I., Ajanusi O.J. et al. The incrimination of *Aedes (stegomyia) aegypti* as the vector of *dirofilaria repens* in Nigeria // Vet. Parasitol. — 2000. — № 4. — P. 319–327.
4. Lee S.-E., Kim H.-C., Chong S.-T. et al. Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea // Vet. Parasitol. — 2007. — № 148. — P. 149–155.
5. Гусева М.В. Роль и место редких гельминтозов в паразитарной патологии России: автореферат диссертации, канд. мед. наук. — М., 2009.
6. Архипов И.А., Борзунов Е.Н., Шайкин В.И. — 2001. W. Tarello. — 2000.
7. Ястреб В.Б. Эпизоотологическая ситуация по дирофиляриозу собак в Московском регионе // Российский паразитологический журнал. — 2008. — № 3.
8. Гуцевич А.В. и др. Насекомые двукрылые. Комары. Фауна СССР. 100. — Л., 1970.
9. Lee S.-E., Song K.-H., Liu J. et al. Comparison of the Acid-phosphatase Staining and Polymerase Chain Reaction for detection of *Dirofilaria repens* infection in Dogs in Korea // J. Vet. Med. Sc. — 2004. — Vol. 66(9). — P. 1087–1089.
10. Murata K., Yanai T. Agatsuma T. et al. *Dirofilaria immitis* Infection of a Snow Leopard (*Uncia Uncia*) in a Japanese ZOO with Mitochondrial DNA Analysis // J. Med. Sc. — 2003. — Vol. 65(8). — P. 945–947.
11. Song K.H., Lee S.-E., Hayasaki M. et al. Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea // Vet. Parasitol. — 2003. — Vol. 114. — P. 231–236.