

УДК 614.449.57

## РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО ЭНТОМОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ И КСЕНОММОНИТОРИНГУ ДИРОФИЛЯРИОЗА

**Криворотова Е.Ю., Нагорный С.А.**

*ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора,  
Ростов-на-Дону, e-mail: krivorotova\_elen@mail.ru*

Настоящие рекомендации по энтомологическому надзору и ксеноммониторингу дирофиляриоза разработаны с целью совершенствования мероприятий по профилактике дирофиляриоза, а также мероприятий по борьбе с переносчиками возбудителей этого заболевания – *Dirofilaria repens* и *D. immitis*. Рекомендации предназначены для энтомологов и помощников энтомолога, а также для других специалистов, занимающихся ксеноммониторингом. В данной статье описаны микроскопические и молекулярно-биологические методы лабораторного исследования комаров на зараженность личинками дирофилярий. Приведены способы расчета сроков эпидемического сезона дирофиляриоза (дат начала и окончания сезонов эффективной заражаемости комаров и передачи дирофиляриоза) и определение количества генераций личинок дирофилярий в комарах. Кратко изложены мероприятия по контролю численности комаров. Рекомендации могут быть использованы специалистами для составления прогнозов по эпидситуации на обследуемой территории.

**Ключевые слова:** дирофиляриоз, сезон эффективной заражаемости комаров, сезон передачи дирофиляриоза, генерация личинок, единица развития дирофилярий

## RECOMMENDATIONS FOR SPECIALISTS IN ENTOMOLOGICAL SUPERVISION AND DIROFILYARIOZ'S KSENONMONITORING

**Krivorotova E.Y., Nagorny S.A.**

*Rostov Research Institute Microbiology and Parasitology of Rosпотребнадзор,  
Rostov-on-Don, e-mail: krivorotova\_elen@mail.ru*

This recommendations for entomological surveillance and xenomonitoring dirofilariasis designed to improve prevention dirofilariasis as well as action against carriers of the disease – *Dirofilaria repens* and *D. immitis*. The recommendations are intended for entomologists and assistant entomologist, as well as other professionals involved in xenomonitoring. This article describes the microscopic and molecular-biological methods of laboratory research mosquitoes infected larvae dirofilaria. Discloses methods for calculating the timing of the epidemic season dirofilariasis (start and end dates of seasons being infected mosquitoes and effective transmission of dirofilariasis) and determination of the number of generations of larvae of mosquitoes in dirofilaria Summarized measures to control mosquito populations. Are briefly discussed measures to control mosquito populations. The recommendations can be used by specialists to make predictions for the epidemic situation in the surveyed area.

**Keywords:** dirofilariasis, season effectively being infected mosquitoes, season transmission dirofilariasis of mosquitoes, *Dirofilaria* development unit

Рекомендации по энтомологическому надзору и ксеноммониторингу дирофиляриоза (далее – Рекомендации) разработаны с целью совершенствования мероприятий по профилактике дирофиляриоза, а также мероприятий по борьбе с переносчиками возбудителей этого заболевания. Настоящие Рекомендации предназначены для энтомологов и помощников энтомолога, а также для других специалистов, уполномоченных на проведение энтомологического мониторинга.

Энтомологический надзор начинают с того, что определяют видовой состав комаров, на подконтрольной территории и их распределение, сезонную и суточную динамику численности, места вытлада личинки и концентрации имаго, степень контакта с человеком, эпидемиологическую значимость отдельных видов.

### Исследование зараженности комаров личинками дирофилярий

Исследовать на дирофиляриоз необходимо комаров семейства Culicidae из родов *Anopheles*, *Aedimorphus*, *Armigeres*, *Ochlerotatus*, *Aedes*, *Culex*, *Coquilletidia* и *Mansonia*, являющихся промежуточными хозяевами дирофилярий. Наибольшее эпидемиологическое значение имеют самки рр. *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*. Исследования проводят методами микроскопии самок и ПЦР.

Подготовку комаров к микроскопическому исследованию на зараженность микрофиляриями проводят согласно МУ 3.1.3012-12 [1]. Насекомых обездвигивают эфиром. Перед вскрытием самкам отрезают крылья и ноги. На предметном стекле под стереоскопическим микроскопом (объектив 3–4 х), придерживая препаратальной иглой брюшко, копьевидной иглой рассекают тело

комара посередине грудного отдела. Для извлечения мальпигиевых желез и кишечника, надрывали хитиновый покров брюшка между 2 и 3 сегментами, считая от заднего конца. Затем одну иглу втыкают в грудь насекомого, другую в конец брюшка и раздвигают их в разные стороны. Для препарирования грудного отдела у комара отсекают голову, надавливают иглой плашмя на грудь насекомого и проводят ею кпереди. Препарат микроскопируют в физиологическом растворе под покровным стеклом (объектив х40). Препараты, приготовленные из самок напитанных кровью, после вскрытия обрабатывают несколькими каплями 3% раствора уксусной кислоты. После высыхания на воздухе, все препараты фиксируют в течение 10–15 минут, окрашивают краской Романовского-Гимза в течение 20–30 минут и микроскопируют при увеличении объектива 90–100 х.

В мальпигиевых железах комаров развиваются только личинки *Dirofilaria* spp. [7]. Личинок из слюнных желез идентифицируют по Hawking и Worms, 1961. Длина менее 1100 мк, анус менее чем в 50 мк от конца тела, каудальные сосочки имеются, один маленький терминальный сосочек с 2 очень маленькими субтерминальными сосочками (или без них) [5]. Методом микроскопии вид личинок рода *Dirofilaria*, найденных в комарах, не определяется [6].

**Морфологическая характеристика** дирофилярий в кровяном сгустке из кишечника комара. У *D. repens* длина 300–360 мкм, ширина 5,8–8,0 мкм. Чехлик отсутствует. Головной конец прямоугольной формы, просветленный, задний конец широкий, длинный, хвостовой конец загнут в виде ручки зонтика. У *D. immitis* длина 262–349 мкм, ширина 4,8–7,0 мкм. Чехлик отсутствует, головной конец в виде конуса темноокрашенный, задний конец тонкий прямой.

**Молекулярно-биологический метод.** Для ПЦР – идентификации *D. repens* используются праймеры: DIR3: F-5'-CCGGTAGACCATGGCATAT-3' и DIR-4: R -5'-CCGTCTTGGACGTTTGGTTA - 3'. Для идентификации *D. immitis* ис-

пользуются праймеры: COI intF-5'-TGATTGGTGGTTTTGGTAA-3' и COI intR 5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3'.

При выделении ДНК необходимо провести предварительное механическое измельчение самок комаров (5–10 особей за 1 пул) в лизирующем растворе с последующим центрифугированием. Дальнейшая работа по выделению ДНК проводится с надосадочной жидкостью.

В результате ПЦР праймеры *D. repens* амплифицируют нуклеотидные последовательности длиной 246 н.п., *D. immitis* – 656 н.п. Оценить «пройденное» ПЦР-продуктом расстояние позволяет специальный маркер (М), содержащий фрагменты с заранее известным количеством нуклеотидных пар.

Использование ПЦР может привести к быстрому, высокопроизводительному скринингу филляриатозов у комаров-переносчиков. Использование современных методов позволит проводить масштабные эпидемиологические и эпизоотологические исследования дирофиляриоза.

#### Определение сроков эпидемического сезона передачи дирофиляриоза

Для оценки эпидемической обстановки по дирофиляриозу используют данные о сроках:

– *сезона эффективной заражаемости комаров* – периода эпидемического сезона, в течение которого местные температурные условия допускают развитие личинок в теле комара до инвазионной стадии (L3);

– *сезона передачи дирофиляриоза* – часть года, в течение которой происходит (или может происходить) передача дирофилярий окончательным хозяевам (собаки, кошки и другие животные отрядов хищные и виверные) и человеку через укусы инвазированных комаров.

Сроки начала и окончания сезонов эффективной заражаемости комаров и передачи дирофиляриоза необходимо рассчитывать ежегодно, так как они существенно меняются в зависимости от колебаний климатических условий каждого года.

#### Режимы амплификации по В. Раковой [4]

Для <i>D. repens</i>		Для <i>D. immitis</i>			
Начальная денатурация – 94°C – 5 мин		Начальная денатурация – 94°C – 30 с			
Денатурация	94°C – 30 с	48 циклов	Денатурация	94°C – 1 мин	30 циклов
Отжиг	50°C – 30 с		Отжиг	50°C – 2 мин	
Элонгация	72°C – 1 мин		Элонгация	72°C – 3 мин	
Элонгация 72°C – 5 мин			Элонгация 72°C – 5 мин		
Хранение – 10°C					

Расчет эпидемического сезона дирофиляриоза должен основываться на метеорологических данных и результатах фенологических наблюдений за кровососущими комарами родов *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, которые являются основными переносчиками дирофиляриоза.

**Определение сроков начала сезонов эффективной заражаемости комаров и передачи дирофиляриоза**

Возбудители дирофиляриоза (*Dirofilaria immitis*) в теле комара развиваются при среднесуточной температуре воздуха окружающей среды, превышающей пороговую (+14°C). При понижении температуры (менее +14°C) развитие возбудителей в теле комара останавливается, при этом личинки сохраняют жизнеспособность.

За начало сезона эффективной заражаемости комаров принимается дата, с которой устанавливаются среднесуточные температуры воздуха выше +14°C. Необходимо учитывать, что эндофильные самки комаров переваривают кровь на дневках (в жилых или помещениях для скота), в которых температура обычно выше, чем температура воздуха окружающей среды, поэтому делается поправка на температуру дневок. Для экзотической части популяций комаров поправка на температуру дневки не делается.

Определение периода передачи дирофиляриоза окончательным и факультативным хозяевам проводят ретроспективно на основе среднесуточных температур воздуха местной метеостанции. Расчет начинают со дня, когда установилась среднесуточная температура воздуха +14°C (0 единиц развития). При температуре, превышающей порог (+14°C), накапливаются единицы развития дирофилярий (ЕРД).

Для расчета ЕРД можно использовать формулу:

$$\text{ЕРД} = \begin{cases} T_{\text{ср.ст}} - 14, & \text{если } T_{\text{ср.ст}} > 14; \\ 0, & \text{если } T_{\text{ср.ст}} \leq 14, \end{cases} \quad (1)$$

где ЕРД – единицы развития дирофилярий;  $T_{\text{ср.ст}}$  – среднесуточная температура воздуха окружающей среды, в °C.

Для развития личинок дирофилярий в комаре до инвазионной стадии необходима сумма эффективных температур в 130 ЕРД. За начало сезона передачи дирофиляриоза принимается дата, когда сумма ЕРД достигла 130.

Сроки развития инвазионных личинок дирофилярий в комарах можно представить в виде формулы

$$\sum_{N_1, 2, \dots, t} [T_{\text{ср.ст}} - 14] = 130 \text{ } ^\circ\text{C}, \quad (2)$$

где  $N_1$  – срок развития первой генерации инвазионных личинок дирофилярий в комарах, т.е. число дней между датой первого превышения пороговой температуры (А) и датой когда сумма разностей достигает 130 (В). Срок последующего развития личинок ( $N_2$ ) будет исчисляться заново от даты В до даты С, когда сумма разностей температур вновь достигнет 130;  $N_3$  от даты С и т.д. до  $N_t$ , когда температура воздуха снижается ниже 14°C.

Для перезимовавших самок расчет начала сезона передачи дирофиляриоза начинают с установленной даты сезона эффективной заражаемости комаров, хотя обычно до эпидемически значимого возраста эти самки фактически не доживают.

**Определение сроков окончания сезонов эффективной заражаемости комаров и передачи дирофиляриоза**

Для определения конца эффективной заражаемости комаров производят расчет даты окончания развития последней возможной генерации личинок в комаре в текущем году. Для этого устанавливают последний день со среднесуточной температурой воздуха выше 14°C (периоды кратковременного потепления после длительного похолодания не учитываются). От этой даты в обратном порядке ведут расчет последнего цикла развития личинок дирофилярий в комарах. Число, на которое приходится сумма в 130 ЕРД, считается датой окончания сезона эффективной заражаемости комаров.

В континентальном климате передача трансмиссивных болезней не может осуществляться круглогодично: в зимний период отсутствуют условия для развития переносчиков и возбудителей в них. Во время холодного периода года (при температуре ниже 14°C) риск заражения дирофиляриозом сводится к нулю.

За окончание сезона передачи дирофиляриоза принимается дата исчезновения последних самок с кровью на дневках, т.к. большая часть комаров зиму проводят в состоянии диапаузы – в этот период они не питаются кровью.

В ряде неблагоустроенных многоквартирных домов передача инвазии при наличии зараженного дирофиляриозом окончательного хозяина может осуществляться круглогодично «подвальными» комарами *Cx. pipiens molestus*. Личинки этого подвиды комаров развиваются в заводненных отапливаемых подвалах. Самки имаго *Cx. p. molestus* автогенны, поэтому популяция в подвале может поддерживаться длительное время и без питания кровью. Однако, второй гонотрофический цикл эти комары

могут проделать только после приема порции крови. В связи с чем, возникает эпидемиологическая опасность в отношении круглогодичной передачи инвазии дирофилярий.

### **Определение количества генераций личинок дирофилярий в комарах**

Длительность сезона передачи зависит от температурных условий. В зависимости от величины суммы ЕРД и продолжительности сезона передачи количества генераций личинок дирофилярий в комарах могут различаться. Количество генераций личинок в сезон определяется:

1) простым делением суммы ЕРД за сезон передачи на  $130 \left( N = \sum \frac{\text{ЕРД}}{130} \right)$ ;

2) с использованием временного фильтра. При этом учитывается, что срок накопления 130 ЕРД не должен превышать 30 дней, т. е. считается, что зараженные комары в дикой природе, как правило, живут не более месяца. Если срок накопления 130 ЕРД превышает 30 дней, необходимо сдвинуть дату отсчета накопления суммы эффективных температур (ЕРД) на более позднее число (сдвигают дату начала расчета на последующий день и повторяют расчет). Если при наборе суммы развития личинок дирофилярий (130 ЕРД) попадают дни с температурой воздуха ниже +14°C, то эти дни опускаются, а суммирование производится по последующим благоприятным дням. При понижении температур на длительное время (более 10 дней) расчет инкубации генераций личинок начинают заново после прекращения холодов и установления температуры воздуха выше пороговой. При втором способе расчета количество генераций личинок дирофилярий в сезон получается более объективным.

С увеличением длительности сезона передачи и количества генераций личинок дирофилярий в комарах риски заражения дирофиляриозом увеличиваются.

### **Мероприятия по контролю численности комаров**

Комплекс мероприятий по контролю численности комаров включает текущий энтомологический и санитарный надзоры, проведение санитарно-предупредительных работ и истребительных мероприятий. Предупредительный и текущий санитарно-энтомологический надзор обеспечивают специалисты Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в соответствии нормативными документами МУ 3.2.2568-09 и МУ 3.2.974-00 [2, 3].

Мероприятия по снижению численности переносчика должны быть направлены на предупреждение заселения водоемов личинками комаров и проведение истребительных дезинсекционных обработок против личинок и имаго. На основании систематических наблюдений за фенологией и экологией переносчиков возбудителей дирофиляриоза специалисты Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека определяют места выплода и массового вылета комаров, видовой состав и численность личинок в водоемах, проводят расчет длительности сроков развития личинок филярий до инвазионной стадии L3 в комарах. По результатам мониторинга определяют сроки, объем необходимых мероприятий и предоставляют экспертные заключения территориальным управлениям Роспотребнадзора, которые организуют истребительные мероприятия.

Предупреждение заселения водоемов личинками достигается проведением работ по благоустройству водоемов и прибрежной территории: очистка водной поверхности от растительности, систематический покос травы в прибрежной полосе. Выбор инсектицидов для обработки объектов и кратность обработок определяют специалисты, выполняющие дезинсекцию, в зависимости от типа объекта, климатической зоны, времени года.

Уничтожение имаго комаров проводят путем опрыскивания водными суспензиями (эмульсиями) инсектицидов в местах дневок комаров, на территории и вокруг питомников собак, в подвальных помещениях, залитых водой. Обработку против имаго следует проводить после вылета перезимовавших комаров и повторять в зависимости от вида выбранных инсектицидов один раз в 4–5 недель.

### **Сроки проведения истребительных мероприятий**

Дезинсекционные обработки проводят по эпидемиологическим и фенологическим показателям, при высокой численности переносчиков в подзащитных зонах.

В течение сезона передачи дирофиляриоза комаров по своему физиологическому состоянию и эпидемиологическому значению условно можно разделить на 4 группы:

- 1) перезимовавшие самки;
- 2) особи весенне-летних генераций;
- 3) диапаузирующие самки (уходящие на зимовку);
- 4) подвальные комары (*Culex p. molestus*).

Сроки первой возможной в сезоне обработки определяются сроками массового вылета комаров с зимовки. Только в годы ранней и теплой весны перезимовавшие самки могут иметь эпидемическое значение, при том, что вылетающих после зимовки самок, как правило, очень мало.

Основные истребительные мероприятия проводятся в весенне-летнее время, а именно – вторая обработка должна быть приурочена к массовому вылету комаров первой генерации, третья – к началу сезона передачи дирофиляриоза.

Показанием для обработок водоемов является нахождение в пробах личинок второго – третьего возрастов комаров первой генерации. Затягивать сроки обработки нельзя, так как личинки старших возрастов более устойчивы к инсектицидам, в связи с чем резко снижается эффективность обработок. Окончание обработок водоемов связывают с датами массового появления диапаузирующих самок.

В конце сезона передачи дирофиляриоза следует регулярно контролировать физиологическое состояние самок популяции с тем, чтобы не проводить обработки по диапаузирующим самкам. Проведение дезинсекционных обработок подвальных помещений проводят по эпидемиологическим показаниям.

#### Список литературы

1. МУ 3.1.3012–12 Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней: издание официальное: утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 4.04.2012. – М., 2012. – 57 с.
2. МУ 3.2.2568-09 Контроль численности кровососущих комаров р. *Culex*, места вылода которых находятся в населенных пунктах: издание официальное: утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 15.12.2009. – М., 2009. – 57 с.
3. МУ 3.2.974-00 Малярийные комары и борьба с ними на территории Российской Федерации: издание официальное: утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 16.05.2000. – М., 2000. – 57 с.
4. Ракова В.М. Молекулярно-биологическая диагностика дирофиляриоза в организмах дефинитивного хозяина и переносчиков: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.11. – М., 2013. – 24 с.
5. Сонин М.Д. Филяриаты животных и человека и вызываемые ими заболевания. Ч.1. Апроктоидеи. – М.: Наука, 1966. – 360 с.
6. Cancrini G. Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships / G. Cancrini, S. Gabrielli // *Mappe Parassitologiche*. – Napoli, 2007. – Vol. 8. – P. 47–58.
7. Sauerman D.M. A survey for natural potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Vero Beach, FL / D.M. Sauerman, J.K. Nayar // *Mosq. News*. – 1983. – Vol. 43, № 2. – P. 222–225.