

УДК: 619:616.995.132.2:615.33:636.7

## ЗАСТОСУВАННЯ АНТИБІОТИКА ДОКСИЦИКЛІНА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ДИРОФІЛЯРІОЗА У СОБАК

Келеберда М. І., Фісенко С. А., Солодянкін О. С., Кузнецов Є. П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Наведено результати досліджень з використання доксицикліна в лікуванні дирофіляріозу у собак. Встановлено, що комбінована терапія з одночасним застосуванням івермектину та доксицикліну дозволяє отримати бажаного лікувального ефекту не піддаючи ризику життя пацієнта.

**Ключові слова:** дирофілярії, мікрофілярії, вольбахії, антибіотики, доксициклін

Високий рівень ураженості собак дирофіляріями і велика кількість переносників створюють явну загрозу і потенційні можливості для зростання інвазування дирофіляріями в багатьох регіонах світу, в тому числі і в Україні. В останні роки дирофіляріозу приділяється значна увага з боку біологів, а також ветеринарних і медичних спеціалістів [1, 2].

Відомо, що абсолютно всі дирофілярії, як і багато інших філяріатозних нематод, несуть в собі бактерій-ендосимбіонтів – вольбахій, від яких залежить репродуктивна здатність і виживання дирофілярій [3, 4, 5].

Яскравою особливістю більшої частини вольбахій нематод є мутуалістичний характер їх взаємовідносин з хазяїном. Хоча природа впливу вольбахій на нематоду-хазяїна невідома, введення антибіотиків дефінітивному хазяїну, ураженому філяріями, призводить до порушення процесу линьки мікрофілярій, що знижує репродуктивну здатність дорослих нематод [4, 6]. Було показано, що залежність філярій від вольбахій відкриває значні перспективи контролю над філяріозами за допомогою антибіотиків [7].

Використання макрофіляріцидної терапії при дирофіляріозі пов'язано з ризиком виникнення емболій судин та сильної інтоксикації організму за рахунок масової гибелі гельмінтів, що в 90 % призводить до смерті тварин. Специфічне лікування антибіотиками, спрямоване на зниження рівня бактерій *Wolbachia* в дирофіляріях, позитивно впливає на організм собак за рахунок зниження індукованих філяріями патологій [4, 7, 8].

У зв'язку з цим **метою нашої роботи** було дослідження ефективності використання антибіотика доксицикліна при лікуванні дирофіляріозу у собак завдяки вивченню змін біологічних властивостей бактерії-ендосимбіонту *Wolbachia* на основі молекулярно-генетичних та електронно-мікроскопічних методів.

**Матеріали та методи:** Вивчення змін біологічних властивостей бактерії-ендосимбіонту *Wolbachia* при лікуванні дирофіляріозу проводили в досліді на собаках спонтанно інвазованих *D. immitis*. Перед початком досліді вивчали видовий склад та інтенсивність інвазії (мікрофіляріємію) за методом Т. І. Попової. З дослідних собак за принципом аналогів були сформовані чотири дослідні групи по три тварини у кожній. Собакам першої групи застосовували мікрофіляріоцидний препарат «Івермексин» підшкірно чотириразово з інтервалом 7 діб. Тваринам другої групи задавали антибіотик тетрациклінової групи, що активний до рикетсій, доксициклін впродовж 30 діб. У третій групі тварин застосовували комплексне лікування з введенням Івермексину та доксицикліну. Четверта контрольна група не отримувала ніяких препаратів. Визначення показників екстенс- та інтенсефективності з паралельним проведенням ПЛР для виявлення ДНК *D. immitis* і *Wolbachia*, електронної мікроскопії мікрофілярій і статевозрілих нематод та вивчення рівня антитіл до *D. immitis* в РІД визначали на 5, 15 та 45 добу після початку введення препаратів.

Вилучення статевозрілих нематод із правих відділів серця та полої вени проводили кардіохірургічним методом під контролем ультразвукової діагностики.

Для ультраструктурного аналізу *Wolbachia* використовували фіксованих та забарвлених ацетатуранілом мікрофілярій та статевозрілих нематод *D. immitis*. Електронну мікроскопію проводили методом негативного контрастування.

**Результати досліджень:** Електронною мікроскопією встановлено, що вольбахії дирофілярій були присутні в усіх досліджуваних зразках, отриманих від статевозрілих нематод та мікрофілярій до лікування тварин та мали вигляд внутрішньоклітинних оогоній розміром від 0,5 мкм до 1,25 мкм коко- та паличкоподібної форми. У клітині вольбахії знаходяться в цитоплазматичних вакуолях і часто оточені мембранами. Для індикації вольбахій методом електронної мікроскопії досліджували цефалічний кінець самиць нематоди, так як саме на ньому знаходиться репродуктивні органи, зокрема, вульва, що збільшувало шанси виявлення цієї бактерії ендосимбіонту.

При проведенні електронної мікроскопії нематод вилучених у собак на 5 добу після застосування доксицикліну також виявляли неушкоджені бактерії, але вже на 15 та 45 добу на їх місці спостерігали інтрацитоплазматичні структури з поверхневою мембраною, які за розміром нагадували вольбахій, та як відомо, протеобактерії, до яких відноситься саме і вольбахія, оточені двома біліпідними мембранами, що дало нам змогу інтерпретувати знімок, як вироджені вольбахії. У групах, які не отримували антибіотик вольбахій спостерігали до кінця досліді.

Дирофілярії, отримані від тварин, що були оброблені доксицикліном, на 45 добу були життєздатними та показували моторику порівняну у нематод вилучених від контрольних тварин. При цьому світловою мікроскопією цефалічного відділу матки самиць дирофілярій в групах контрольних тварин та оброблених доксицикліном спостерігали різницю вмісту матки. Так в контрольній

групі тварин при дослідженні цефалічного відділу матки нематод виявляли личинок мікрофілярій L<sub>2</sub> та L<sub>3</sub> стадій розвитку, тоді як у нематод вилучених від собак, які отримували доксициклін в матці спостерігали яйця, що вказувало на затримку розвитку мікрофілярій від яйця до личинок в зв'язку з бактеріостатичною дією антибіотика на *Wolbachia*, що інгібує розвиток мікрофілярій в цефалічній частині матки.

При дослідженні нематод на вміст матки в групі тварин, де використовували мікрофіляріоцидні препарати ознак дегенеративного розвитку в матці впродовж терміну спостереження (45 діб) не було виявлено. У групі собак, де застосовувалися івермексин разом з доксицикліном затримку розвитку з яйця до личинки спостерігали тільки на 45 добу після початку курсу антибіотика.

Оскільки світлова мікроскопія не дозволяє надійно диференціювати зvierодніння мікрофілярій з яйця до личинки, тому що ембріони можуть бути такі, що розвиваються або вироджуються, було випробувано інший підхід перевірки присутності вольбахій в матці дирофілярій з використанням специфічного праймеру вольбахій компліментарного до ділянки *ftsZ* у ПЛР. Крім того, у крові дослідних собак визначали ДНК *D. immitis*, щоб з'ясувати терміни циркуляції ДНК дирофілярій за використання протидирофіляріозної терапії. При проведенні ПЛР до лікування та на 5 добу після антибактеріальної та мікрофіляріоцидної терапії ДНК *D. immitis* та *Wolbachia* реєстрували у всіх тварин (таблиця). На 15 добу у крові тварин, яким застосовували івермексин ДНК вольбахії та дирофілярії в мікрофіляріях не ідентифікували, а вже на 45 добу у крові тварин знову почали з'являтися мікрофілярії. У тварин, які отримували доксициклін відсутність ДНК вольбахії реєстрували тільки на 45 добу після початку лікування, а генетичний матеріал дирофілярій був присутнім в крові собак до кінця дослідження, що не корелювало з результатами електронної мікроскопії, так як вже в цей період у самиць нематод вилучених з собак цієї групи були ознаки зvierодніння мікрофілярій до яйця. Дані отримані у ПЛР до праймеру вольбахій компліментарного до ділянки *ftsZ* співпадали з результатами, отриманими при електронній мікроскопії маток нематод.

**Таблиця –** Результати вивчення ефективності антибактеріальної та мікрофіляріоцидної терапії дирофіляріозу собак (n=3)

Групи тварин та термін дослідження		Показники			
		EI, %	II, екз/см <sup>3</sup>	ДНК <i>D. immitis</i>	ДНК <i>Wolbachia</i>
івермексин	до лікування	100	590±153	+++	+++
	5 доба	100	42±20	+++	+++
	15 доба	0	-	+++	+++
	45 доба	66,6	5±1	+++	+++
доксициклін	до лікування	100	766±194	+++	+++
	5 доба	100	537±267	+++	+++
	15 доба	66,6	97±46	+++	+++
	45 доба	33,3	33±8	+++	---
івермексин+ доксициклін	до лікування	100	843±217	+++	+++
	5 доба	100	31±6	+++	+++
	15 доба	0	-	---	++-
	45 доба	0	-	---	---
контроль	до лікування	100	283±105	+++	+++
	5 доба	100	296±84	+++	+++
	15 доба	100	530±75	+++	+++
	45 доба	100	1020±210	+++	+++

Примітки: «+» – позитивна реакція, «-» – негативна реакція

Оптимальною виявилася схема лікування дирофіляріозу, де використовували івермексин разом з доксицикліном, ДНК дирофілярії при цьому не ідентифікували починаючи з 15 доби і до кінця дослідження, а ДНК вольбахії виділили у двох тварин у 15 діб і більше не реєстрували. При ЕМ репродуктивного тракту самиць дирофілярій вже в цей період з'являлися інтрацитоплазматичні структури, що вказувало на більшу чутливість ПЛР у порівнянні з електронною мікроскопією щодо виявлення мікроорганізмів.

Аналіз показників інтенсивності інвазії (кількість мікрофілярій/см<sup>3</sup>) показав високу ефективність схеми лікування дирофіляріозу за одночасного використання івермексину та доксицикліну, що підтверджувалося молекулярно-генетичними дослідженнями, а саме визначенням ДНК дирофілярій. За такого способу мікрофілярії не визначалися в крові вже на 15 добу після початку лікування. При використанні івермексину мікрофілярії також зникали у крові собак на 15 добу після лікування, а потім знову виявлялися на 45 добу.

При визначенні титру антитіл до *D. immitis* в крові дослідних собак не було встановлено закономірностей впливу антибіотикотерапії та застосування мікрофілярицидних препаратів на перебіг дирофіляріозу. Антитіла виявляли в титрі 1:2-1:8, як до так і після застосування лікувальних препаратів.

Отже, антибіотикотерапія хазяїв, заражених дирофіляріями, приводила до гальмування розвитку гельмінтів, а саме перешкождала їх линьці - невід'ємному компоненту процесу перетворення личинки в дорослу особину, що викликало морфологічні зміни в матці паразита та різке зниження кількості мікрофілярій і забезпечувало стерильність самиць гельмінтів.

**Висновки:** Дослідним шляхом, за допомогою молекулярно-генетичних методів, визначена оптимальна схема лікування дирофіляріозу, де використовували івермексин разом з доксицикліном, не піддаючи ризику життя пацієнта.

**Перспектива подальших досліджень:** подальші дослідження будуть спрямовані на розробку методики діагностики дирофіляріозу та його лікування з використанням антибактеріальних засобів.

### Список літератури

1. Dirofilarial infections in Europe/ Genchi C., Kramer L.H., Rivasi F. Vector-borne and zoonotic diseases. 2011. Т. 11. № 10. С. 1307-1317
2. Сонин М.Д. Филяриаты животных и человека и вызываемые ими заболевания.-М., 1975.-С.-270-273.
3. Van Borm S., Wenseleers T., Billen J., Boomsma J.J. Wolbachia in leafcutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings // J. Evol. Biol. 2001. V. 14. № 5. P. 805-814.
4. Мальцева Б.М. Симбиотическая система — филярии и бактерия Wolbachia: эволюция системы, патогенез и лечение филяриатозов // Ветеринария. 2004. № 1. С. 34-38.
5. Бескровная Ю.В. Идентификация микрофилярий *Dirofilaria* spp. с помощью ПЦР / Ю.В. Бескровная, С.А. Нагорный // Матер. докл. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – вып. 9. – Москва. – 2008. – с. 73-75.
6. The molecular diagnosis of dirofilariasis in vector mosquitoes in felariye district of Kayseri /Biskin Z., Duzlu O., Yildirim A., Inci Aturkiye Parazitoloj Derg. 2010;34(3):2005
7. Богданова Т.В. Лабораторная диагностика и лечение дирофиляриоза собак / Полковниченко А.П.// Материалы межд. научно-практической конференции: «Проблемы ресурсодобывающего производства и переработки экологически чистой с/х продукции». - Астрахань, 2006 – С.82-83.
8. Поживил А.И., Петренко О.Ф., Чомко В.Н., Величко С.В., Носата Н.С. Диагностика и лечение дирофиляриоза собак.// 36. матер. IV Міжн. наук.-практ. конф. 14-15 жовтня 1999 р., м. Київ// Проблеми ветеринарного обслуговування дрібних домашніх тварин.- К., 1999.-С.78-81.

## THE ANTIBIOTIC DOXYCYCLINE TO TREAT DOGS DIROFILARIASIS

**Keleberda M. I., Fisenko S. A., Solodyankin O. S., Kuznetsov E. P.**

*National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine*

**Objective.** To investigate the effectiveness of using the doxycycline in the treatment of dirofilariasis in dogs.

**Materials and Methods.** The study of changes the biological properties of bacteria-endosymbiont *Wolbachia* in the dirofilariasis treatment performed in experiments on 4 groups of dogs spontaneously infested *D. immitis*. For dogs of the first group used the anti-microfilaridal drug "Ivermexyn" fourfold subcutaneously with an interval of 7 days. The animals of the second group used the antibiotic tetracycline group active to rickettsiae, a doxycycline for 30 days. For the third group of animals was used combined treatment with the introduction Ivermexyne and doxycycline. The fourth a control group did not receive any medication. Definition of indicators of ekstens-intensefficiency with parallel PCR, electron microscopy, RID in study of antibodies to the *D. immitis*, was conducted in 5, 15 and 45 day after the start of the drugs administration.

**Research results:** optimal treatment regimen of dirofilariasis where ivermexyne used with the doxycycline, dirofilaria DNA is not identified from a 15 day of the experiment, wolbachia DNA was found in two animals at day 15 and no longer recorded.

**Conclusions:** empirically, using a molecular genetic techniques, was identified the optimal treatment regimen dirofilariasis where ivermexyne used with doxycycline without risking for the patient's life.

**Keywords:** dirofilaria, mikrofilaria, wolbachia, antibiotics, doxycycline