

«Сейфуллин окулары–12: Ғылым жолындағы жастар - болашақтың инновациялық әлеуеті" атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения–12: Молодежь в науке-инновационный потенциал будущего». – 2016. – Т.І, ч.1. – С. 260-264

## **ДИНАМИКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ ПРИ ЭХИНОКОККОЗЕ И ТЕНИИДОЗЕ СОБАК**

*А.К. Булашев, О.С. Акибеков, С.С.Токпан,  
Ш.С.Серикова, Г. Мухитден*

Своевременное выявление собак, инвазированных *Echinococcus granulosus*, а также мониторинг внешней среды на предмет присутствия возбудителя болезни являются актуальной задачей ветеринарной науки и практики. Золотым стандартом обнаружения эхинококка у дефинитивных хозяев остается метод седиментации кишечного содержимого убитых животных. Для прижизненной диагностики используется дегельминтизация собак ареколином. Однако, эти методы не дают объективных результатов, поскольку яйца эхинококков морфологически не отличаются от яиц других видов тениид [1]. В диагностике эхинококкоза были испытаны серологические тесты, такие как сколекспреципитация, непрямая гемагглютинация, реакция связывания комплемента и другие. Однако, упомянутые методы характеризовались низкой чувствительностью, а также недостаточной специфичностью из-за использования в них сложных антигенов гельминта, в том числе продуктов метаболита в виде жидкости эхинококкового пузыря [2]. Последний содержит многочисленные липо- и гликопротеины, соли, углеводы и липиды, а также сложную смесь белков хозяина и возбудителя болезни - *E. granulosus* [3- 6]. Тем не менее, современные серологические тест-наборы, в основном, базируются на использовании жидкости эхинококкового пузыря в иммуноферментном анализе (ИФА) в качестве целевого антигена. Поэтому, доступные иммунодиагностические тесты лишены стандартизации антигенамишени и это обстоятельство отражается на низкой чувствительности и специфичности серологической диагностики [7]. Следовательно, при серологической диагностике эхинококкоза необходимо проводить подтверждающие анализы вследствие недостаточной видовой специфичности тестов и возможности перекрестных реакций с другими паразитами [8]. Например, серодиагностика эхинококкоза собак затруднена из-за антигенных сходств между его возбудителем и цестодой, вызывающей тениидоз - *Taenia hydatigena* [9], который паразитирует в тонком кишечнике собак и других плотоядных животных. В этой связи, определенный интерес представляют изучение антигенных свойств экскреторно-секреторного антигена (ЭС-Аг)

личиночной и/или имагинальной форм *E. granulosus*, выделяемых ими в процессе культивирования *in vitro*, и возможности использования его в серологической диагностике эхинококкоза собак. К сожалению, научных изысканий в этой сфере крайне недостаточны, что в определенной степени связано с трудностями в получении достаточного количества ЭС-Аг эхинококка. Описаны результаты определения антител в крови зараженных собак против ЭС-Аг протосколекса *E. granulosus*, выращенного в культуральной среде [10]. ЭС-Аг личинки паразита был испытан и в иммунодиагностике цистного эхинококкоза у людей [11]. Изучены также иммунные ответы мышей Balb/c к антигенам взрослого эхинококка, выращенного *in vitro* [12]. Однако, ценность ЭС-Аг взрослого цепня, выделенного из питательной среды, в диагностике эхинококкоза собак до сих пор остается не изученной. Кроме того, гематологические параметры собак, зараженных эхинококкозом, и их ценность в диагностике болезни остаются неизученными.

Целью наших исследований явилось определение возможности использования ЭС-Аг взрослой и личиночной форм *E. granulosus*, полученного в процессе культивирования их *in vitro*, в качестве антигена для серологической диагностики эхинококкоза собак, а также изучение динамики гематологических показателей крови в процессе экспериментальной инвазии.

В работе были использованы 10 гол. собак. Восемь из них (№8-№15) на 35-ый день после последней дегельминтизации были заражены орально жизнеспособными протосколексами *E. granulosus*, полученными от гидатидных цист овец. Две собаки (№6-№7) заражались *Cysticercus tenuicollis* – личинками *T. hydatigena*. У собак обеих групп перед заражением, далее на 12, 30 и 35 дни инфекции были взяты образцы крови для гематологических и серологических исследований. На 35 и 70 дни собаки, зараженные соответственно *E. granulosus* и *C. tenuicollis*, подвергались эвтаназии. Гематологические исследования крови проводили с помощью автоматического гематологического анализатора Advia 2120i с модулем окраски мазков. Личинки цестод, взятые от больных овец во время убоя, культивировали в неполной среде RPMI-1640 с добавлением пенициллина и стрептомицина в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. Образцы супернатанта личинок концентрировали с помощью ПЭГ 6000 до содержания белка 250-1000 мкг/мл и использовали как ЭС-Аг. Для получения ЭС-Аг взрослой формы *E. granulosus* и *T. hydatigena* цестоды были изолированы из тонкой кишки собак и перенесены в матрасы с неполной питательной средой RPMI-1640 с вышеуказанными антибиотиками. Собранную культуральную жидкость сливали в стерильные пробирки и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант диализовали против дистиллированной воды, используя диализную трубку при температуре 4°C в течение суток. Концентрирование ЭС-Аг проводили с помощью ультрафильтрационного устройства.

Серологические исследования собак проводили по стандартной методике

непрямо- го варианта ИФА с использованием полистироловых 96-луночных плоскодонных планшетов для иммунологических реакций.

Результаты исследований показали, что в процессе инвазии происходит существенное повышение концентрации гемоглобина и количества эритроцитов. Так, например, если до заражения упомянутые показатели составляли  $120,9 \pm 4,38$  г/л и  $5,63 \pm 0,25 \cdot 10^{12}/л$ , то перед эвтаназией (35 день после заражения) достигали  $145,2 \pm 4,40$  г/л и  $6,56 \pm 0,21 \cdot 10^{12}/л$ , соответственно. На 12 день заражения отмечено увеличение цветного показателя, среднего содержания и средней концентрации гемоглобина в эритроците. Эти изменения происходили на фоне уменьшения среднего объема эритроцитов и распределения гемоглобина по объему.

По мере развития инвазии отмечалось значительное снижение количества лейкоцитов от  $20,56 \pm 7,81 \cdot 10^9/л$  до  $10,43 \pm 1,33 \cdot 10^9/л$ . Причем, уменьшение общего числа белых кровяных клеток происходило за счет моноцитов. Количество последних перед заражением находилось в пределах  $6,24 \pm 2,39 \cdot 10^9/л$ , тогда как к концу опыта снизилось до  $1,24 \pm 0,59 \cdot 10^9/л$  (30 день) и  $1,91 \pm 0,57 \cdot 10^9/л$  (35 день).

Заметные изменения в крови наблюдались в содержании эозинофилов и лимфоцитов. При этом, отмечалось как абсолютное, так и относительное увеличение количества эозинофилов. Если перед заражением общее число эозинофилов было равно  $0,08 \pm 0,03 \cdot 10^9/л$ , а процентное содержание составляло лишь  $0,77 \pm 0,35\%$ , то на 35 день инвазии эти показатели возросли в 9,6 и 7,7 раза, соответственно. К 30 дню зарегистрированы достоверные повышения как относительного, так и абсолютного количества лимфоцитов:  $26,0 \pm 3,14\%$  и  $3,37 \pm 0,35 \cdot 10^9/л$ , соответственно. Процентное содержание сегментоядерных нейтрофилов не подвергалось к существенным изменениям, хотя на 12 день заражения установлено значительное увеличение их количества ( $5,31 \pm 0,66 \cdot 10^9/л$ ).

Аналогичная динамика общего количества лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов установлена при исследований образцов крови собак, зараженных *S. tenuicolis*. Однако, содержание эритроцитов и концентрация гемоглобина у данной группы животных не подвергались существенным изменениям. Следует лишь отметить, что в ходе развития болезни как относительное, так и абсолютное содержание базофилов имели тенденцию к увеличению.

Экспериментальную инвазию удалось вызвать у всех подопытных собак, за исключением одной головы (№13). Причем, интенсивность заражения была разной при одной и той же дозе личинок эхинококка (8000 экз.). Однако, интродукция протосколексов в количестве 75000 экз. приводила к более выраженной колонизации тонкого отдела кишечника эхинококками. Интенсивность инвазии при заражении собак *S. tenuicolis* также не зависела от количества личинок.

Весьма важно отметить, что собака, оставшаяся стерильной после

заражения (№13), и ее аналог с одним эхинококком (№14) не отличались от своих инвазированных сверстников по динамике гематологических показателей. Например, если у собаки

№10, имевшей максимальное количество гельминтов по результатам патологоанатомического вскрытия (41 609 шт.), концентрация гемоглобина, количества эритроцитов и эозинофилов к концу опыта увеличились соответственно на 31%, 32% и 375%, а число лейкоцитов снизилось на 68%. Такая же динамика была зарегистрирована у ее аналогов, противостоявших экспериментальной инвазии, под №13 (18%, 13%, 212% и 33%, соответственно) и под №14 (21,7%, 8,7%, 200% и 58,9%, соответственно). На 12-ый день после инвазирования животных титр антител, специфичных к ЭС-Аг взрослого эхинококка, достиг 1:1 3200-1:6 400 и поддерживался на этом уровне до эвтаназии (35 день). Результаты серологических исследований показали развитие специфического иммунного ответа в организме всех подопытных животных, зараженных протосколексами эхинококка, в том числе у собак №13 и №14, проявивших устойчивость к инвазии.

Антительная активность сыворотки крови зараженных собак была более высокой при использовании в ИФА ЭС-Аг протосколекса *E. granulosus*, нежели антигена взрослой цестоды. Перед эвтаназией (35 день) титры антител против метаболитов личинок эхинококка у четырех собак находились в пределах от 1:6 400 до 1:25 600, а у остальных животных специфические антитела выявлялись до разведения сывороток крови 1:102 400.

При использовании в ИФА анти-эхинококковой сыворотки перекрестные реакции более выражены между антигенами личинок, нежели взрослых цестод. Так, например, антитела собак №№ 11, 12, 13 и 15 в одинаковой степени вступали в реакцию с экскреторными продуктами личинок обоих видов тениид (ЭС-АГ протосколекса *E. granulosus* и *S. tenuicolis*), и только антисыворотка собаки №14 давала возможность отличить родственные антигены в титрах выше 1:12 800. При сравнении титров антител против ЭС-Аг взрослой формы *E. granulosus* и *T. hydatigena* видно, что сыворотки собак, зараженных эхинококкозом, в титрах выше 1:400-1:800 позволяют дифференцировать антигены взрослых тениид.

У собак, зараженных гидатигенным тениидозом, титры антител против ЭС-Аг *T. hydatigena* по результатам ИФА на 12, 30 и 35 дни опыта имели тенденцию к росту

- 1:6400, 1:25600 и 1: 51200, соответственно. Следует отметить, что антителидозная сыворотка, в отличие от анти-эхинококковой сыворотки, в равной степени вступала в перекрестную реакцию с ЭС-Аг протосколекса и взрослой формы эхинококка. Причем, кросс-реактивность первой сыворотки отмечалась лишь в ее начальных титрах - 1:200 и 1:400, соответственно.

Таким образом, *in vitro* метаболиты взрослой формы *E. granulosus* могут быть использованы в качестве антигена для серологической диагностики эхинококкоза собак. Гематологические показатели и серологические

результаты имеют прогностическое значение при скрининге собак на эхинококкоз, однако у отдельных индивидуумов они могут отражать состояние устойчивости к инвазии. В этой связи, для достоверного выявления собак, инвазированных эхинококкозом, необходимо разрабатывать методы, основанные на непосредственном обнаружении антигенов паразита в фекалиях.

### Список литературы

1 Mathis A., Deplazes P. Diagnosis of *Echinococcus granulosus* and *E.multilocularis* in animals and identification in environmental samples // *Echinococcosis in Central Asia: Problems and Solutions/* Edited by P.Torgerson and B.Shaikenov.-Zurich-Almaty, Publishing house «Daur».-2004.-P.149-158.

2 Бессонов А.С. Цистный эхинококкоз и гидатидоз.- М: ЗАО «Локус Стэнди», 2007.- с.282-308.

3 Gottstein B., Eckert J., Michael S.A., Thompson R.C. *Echinococcus granulosus* antigens: immunoelectrophoretic and Western blot analysis of hydatid cyst fluids // *Parasitol. Res.- 1987.-Vol.73,№2.-P.186-189.*

4 Frayha G.J., Bahr G.M., Haddad R. The lipids and phospholipids of hydatid protoscolices of *Echinococcus granulosus* (Cestoda) // *Int .J. Parasitol.- 1980.-Vol.10, № 3.-P.213-216.*

5 Frayha G.J., Haddad R. Comparative chemical composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* (Cestoda) // *Int. J. Parasitol. -1980.- Vol.10, № 5-6.-P.359-364.*

6 Aziz A, Zhang W, Li J, Loukas A, McManus DP, et al. (2011) Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J Proteomics* 74: 1560–72.

7 Pagnozzi D., Biosa G., Addis M.F., Mastrandrea S., Masala G., Uzzau S. An easy and efficient method for native and immunoreactive *Echinococcus granulosus* antigen 5 enrichment from hydatid cyst fluid// *PLoS One. 2014 Aug 13;9(8):e104962. doi: 10.1371/ journal.pone.0104962. eCollection 2014.*

8 Schweiger A., Grimm F., Tanner I., Müllhaupt B., Bertogg K., Müller N. Deplazes P. Serological diagnosis of echinococcosis: the diagnostic potential of native antigens // *Infection. -2012.- Vol.40, №2.- P.139-152.*

9 Casaravilla C., Malgor R., Rossi A. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory-secretory products of adult *Echinococcus granulosus*, and their application to coproantigen detection // *Parasitology International.- 2005. - Vol. 54, №1.- P.43- 49.*

10 Carmena D., Benito A. Martínez J., Guisantes J.A. Preliminary study of the presence of antibodies against excretory-secretory antigens from protoscolices of *Echinococcus granulosus* in dogs with intestinal echinococcosis // *Mem Inst*

Oswaldo Cruz. – 2005.-Vol.100, №3.-P.311- 317.

11 Carmena D., Martínez J., Benito A., Guisantes J.A. Characterization of excretory- secretory products from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis// *Parasitology*.- 2004.- Vol.129, Pt 3.-P.371-378.

12 Rahimi H.R., Sarkari B., Mohammadzadeh T., Sadjjadi S.M. Immune responses to antigens of in vitro reared *Echinococcus granulosus* adult worms in Balb/c mice// *Iran J Immunol*.- 2011.- Vol.8, №4.-P.236-243.