

## ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК 636.7:618.576.895131.56 (045)

РАЗРАБОТКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ  
ЭХИНОКОККОЗА СОБАК<sup>1</sup>А.К. Булашев, доктор ветеринарных наук<sup>1</sup>О.С. Акибеков, кандидат ветеринарных наук<sup>1</sup>Г. Мухитден, магистр технических наук<sup>1</sup>Ш. Серикова, кандидат биологических наук<sup>2</sup>С.С. Токпан, кандидат ветеринарных наук<sup>1</sup>Казахский агротехнический университет  
им.С.Сейфуллина, Астана, Республика Казахстан<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной биотехнологии, Астана,

Республика Казахстан

E-mail: aytbay57@mail.ru

*Ключевые слова:* эхинококкоз собак, *Echinococcus granulosus*, диагностика, иммуноферментный анализ, экскреторно-секреторный антиген, поликлональные антитела, моноклональные антитела

*Реферат.* Эхинококкоз стал высокоэндемичным зоонозным заболеванием в бывших советских республиках Средней Азии, в том числе в Казахстане, из-за увеличения практики домашнего забоя скота и несоблюдения периодической обязательной дегельминтизации собак. В этой связи особую актуальность приобретают своевременное выявление собак, зараженных возбудителем болезни – *Echinococcus granulosus*, а также мониторинг окружающей среды на предмет присутствия паразита. Известные методы прижизненной диагностики эхинококкоза у дефинитивных хозяев остаются малоэффективными. В настоящей работе приведены результаты исследований по разработке ИФА-теста для выявления собак, инвазированных эхинококками, на основе обнаружения антигена цестоды в образцах фекалий. Основными реагентами тест-системы являются кроличьи поликлональные и мышинные моноклональные антитела, имеющие специфичность к экскреторно-секреторному антигену личиночных и взрослых форм *E. granulosus*. Испытание диагностикума на образцах фекалий экспериментально зараженных собак показало, что он позволяет дифференцировать копроантигены двух близкородственных цестод: *E. granulosus* и *T. hydatigena*. Кoproантиген эхинококка обнаруживался в стуле собак на 5-й день после заражения и детектировался до 30-го дня эксперимента (время наблюдения). Результаты исследований свидетельствуют о возможности использования ИФА-теста для прижизненной диагностики эхинококкоза собак. По мнению авторов, для внедрения ИФА-теста в диагностику эхинококкоза необходимо установить продолжительность элиминации копроантигена после дегельминтизации, что позволит определить сроки повторного исследования собак с целью подтверждения освобождения организма от паразита.

DEVELOPMENT OF IMMUNOTECHNIQUE USED FOR DIAGNOSTICS  
OF DOG ECHINOCOCCUS DISEASE<sup>1</sup>Bulashev A.K., Dr. of Veterinary Sc.<sup>1</sup>Akibekov O.S., Candidate of Veterinary Medicine<sup>1</sup>Mukhitden G., MSc of Technology<sup>1</sup>Serikova Sh., Candidate of Biology<sup>2</sup>Tokpan S.S., Candidate of Veterinary Medicine

<sup>1</sup>Saken Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Astana, the Republic of Kazakhstan

<sup>2</sup>Research Institute of Agricultural Biotechnology, Astana, the Republic of Kazakhstan

*Key words:* dog echinococcus, Echinococcus granulosus, diagnostics, immune and enzyme analysis, excretory and secretory antigens, polyclonal antibody, monoclonal antibody.

*Abstract.* Echinococcus has become high endemic zoonotic disease in the former Soviet republics of Central Asia, i.e. Kazakhstan, due to higher slaughter and dehelminthization of dogs. Due to this fact, early recognition of dogs infected by Echinococcus granulosus and environmental monitoring on parasites are very relevant and important. Certain methods of echinococcus diagnostics are inefficient. The paper reveals the results on development of immune and enzyme test for recognition of the dogs infected by echinococcus on the basis of finding the gid tapeworm antigens in excrements. The main agents of test system are rabbit polyclonal antibodies and mice monoclonal antibodies that are specific to excretory and secretory antigens of larvae and adult forms of E. granulosus. The authors did experiment on the excrements of experimentally infected dogs and diagnostic agent has shown that it differentiates coproantigens of two closely related gid tapeworms: E. granulosus and T. hydatigena. Coproantigens of echinococcus was observed in the dogs excrements on the 5<sup>th</sup> days after being infected and was detected till the 30<sup>th</sup> day of the experiment. The research results speak about the possibility to use immune and enzyme analysis for diagnostics of echinococcus. The authors suggest to introduce immune and enzyme test into echinococcus diagnostics and set the coproantigen elimination after dehelminthization that can define the period of re-examination in order to confirm no parasites in the organism.

В Казахстане, начиная с 1995 г., наблюдается непрерывный рост заболеваемости людей эхинококкозом. За это время заболеваемость выросла почти в 5 раз. Причиной резкого роста динамики эхинококкоза является снижение уровня ветеринарного обслуживания после распада Советского Союза и изменение технологии разведения животных. Источником заражения человека и животных эхинококкозом, как правило, являются собаки, прежде всего, беспризорные, приотарные и поселковые, которые вместе с экскрементами выделяют во внешнюю среду зрелые членики, наполненные яйцами. В условиях формирования частных семейных хозяйств количество служебных собак увеличилось в 8–12 раз, что способствовало повышению риска инфицирования людей эхинококкозом [1].

В этой связи своевременное выявление собак, инвазированных *Echinococcus granulosus*, а также мониторинг окружающей среды на предмет присутствия возбудителя болезни являются актуальной задачей ветеринарной науки и практики.

Прижизненный диагноз на эхинококкоз ставится исследованием фекалий собак по методу Фюллеборна, обнаруживая яйца тениидного типа. Для дифференциальной диагностики проводят гельминтоскопию, и по строению зрелых члеников устанавливают вид гельминта. Однако микроскопическое обнаружение яиц в фекальном материале весьма затруднено, поскольку яйца эхинококков морфологически не отличаются от яиц других видов тениид. Поэтому большую практическую значимость имеют иммунологические и/или гене-

тические методы диагностики эхинококкоза, основанные на обнаружении в образцах фекалий собак антигенов [2–4] и/или участков ДНК паразита [5, 6] соответственно. Но, к сожалению, до сих пор в ветеринарной практике отсутствует стандартизированный диагностический тест для мониторинга эхинококковой инвазии у собак, что является основным препятствием на пути к осуществлению программы борьбы с эхинококкозом [7, 8]. Для диагностической практики нужны иммунологические тесты, характеризующиеся высокой чувствительностью и специфичностью, а также стандартностью реагентов и воспроизводимостью результатов.

Целью работы явилось разработка сэндвич-ИФА (с-ИФА) для обнаружения копроантигена *E. granulosus* у собак, зараженных эхинококкозом.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Лабораторные животные.** Десять собак в возрасте 3 месяцев были предварительно вакцинированы против инфекционных болезней (чумы, парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита, лептоспироза и аденовирусов) и подвергнуты дегельминтизации. Восемь голов были заражены орально 8000–75000 жизнеспособными (>80%) протосколексами *E. granulosus*, полученными от гидатидных цист овец. Отбор эхинококковых цист производили во время забоя овец на убойном пункте «Алтын-тага», расположенном в Целиноградском районе Акмолинской

области Республики Казахстан. Двух собак заражали орально *Cysticercus tenuicollis* – личинками *Taenia hydatigena*. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики (GLP). Комбикорма и воду собакам давали ad libitum. На проведение экспериментов с животными было получено разрешение этической комиссии Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. На 35-й и 70-й день эксперимента собак, зараженных соответственно *E. granulosus* и *T. hydatigena*, подвергали эвтаназии для патолого-анатомического вскрытия путем последовательной внутримышечной инъекции ксилазина в дозе 2 мг/кг и внутривенной инъекции повышенной дозы анестозола в дозе 15 мг/кг. После вскрытия тонкий отдел кишечника исследовали на наличие паразитов в соответствии с рекомендациями ВОЗ/МЭБ [9].

**Образцы стула** от каждой собаки собирали через каждые 5 дней, начиная с 5-го дня после заражения и до 30-го дня эксперимента. Материал вносили в пробирку с 1%-м раствором 40%-го формальдегида и забуференного физиологического раствора (ЗФР) в соотношении 1:4, энергично встряхивали до получения однородной суспензии, а затем кипятили в течение 20 мин на водяной бане с целью обеззараживания. Далее материал центрифугировали в течение 10 мин при 2200g, супернатанты делили на аликвоты и хранили в замороженном виде при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Антитела.** IgG-фракция поликлональных антител (ПКА) кролика, иммунизированного ЭС-Аг взрослой формы *E. granulosus*, была приготовлена по методике, описанной нами ранее [10]. Моноклональные антитела (МКА) Egp1 и Egp2 получали путем культивирования in vitro соответствующих гибридом, созданных нами в предыдущих исследованиях [11]. МКА из культуральной жидкости гибридом связывались в непрямом ИФА (н-ИФА) с экскреторно-секреторным антигеном (ЭС-Аг) протосколекса *E. granulosus* до титра 1:8–1:16, тогда как положительная реакция против аналогичного антигена близкородственной личинки *C. tenuicollis* отмечалась только в начальном разведении супернатанта (1:2).

**Получение ЭС-Аг цестод.** Протосколексы отстаивали под действием силы тяжести, несколько раз промывали в ЗФР и сразу же переносили в питательную среду Игла (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) для культивирования. Жизнеспособность протосколексов оценивали по подвижности путем

прогревания среды над пламенем горелки [12,13]. Для дальнейшей работы отбирали личинки с жизнеспособностью не менее 90%. Протосколексы культивировали по методике, описанной ранее [9], с некоторыми изменениями. Протосколексы в количестве 5000 личинок на 1 мл культивировали в 10 мл неполной среды Игла с добавлением пенициллина 105 МЕ/л (Сибирская ветеринарная компания, Новосибирск, Россия), стрептомицина 100 мг/л (ОАО «ХимФарм», Шымкент, Казахстан) при  $37^{\circ}\text{C}$  в 5%-м  $\text{CO}_2$ . Надосадочную жидкость, содержащую ЭС-Аг протосколексов *E. granulosus*, отбирали через каждые 8 ч в течение первых 48 ч культивирования, заменяя ее тем же объемом свежей среды. Перед каждой сменой среды жизнеспособность личинок определяли по вышеописанной методике. Собранные супернатанты концентрировали с использованием полиэтиленгликоля 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) и использовали как ЭС-Аг протосколексов. ЭС-Аг *C. tenuicollis* и *T. hydatigena* получали по этой же методике.

**Определение ЭС-Аг гельминта и/или копроантигена (КАг) в образцах фекалий собак в с-ИФА по схеме: МКА+ЭС-Аг/КАг+ПКА.** Лунки полистироловой планшеты (Alto, Милан, Италия) сенсibiliзировали МКА в концентрации 5 мкг/мл (100 мкл на лунку в бикарбонатном буфере (БКБ) с pH 9,6) в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ . Затем активные центры твердой фазы блокировали 1%-м раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , трижды промывали ЗФР (pH 7,0–7,2) и столько же ЗФР с твином-20 (ЗФР-Тв). Далее в лунках готовили отдельные серийные разведения ЭС-Аг *E. granulosus* и *T. hydatigena* (*C. tenuicollis*) в ЗФР или образцов фекалий зараженных собак. Планшет помещали на 1 ч в термостат, отрегулированный на  $37^{\circ}\text{C}$ . В качестве контроля использовали образец стула, взятый до заражения собак. Затем планшет отмывали вышеописанным способом, вносили в лунки IgG-фракцию ПКА кролика и инкубировали в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . После повторения процедуры отмывки в лунки вносили конъюгат – антитела против кроличьего IgG (H+L), меченные пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Миссури, США), и продолжали инкубацию в том же режиме. Наличие иммунного комплекса выявляли раствором субстрата с тетраметилбензидином (ТМБ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) в течение 15 мин при комнатной температуре на шейкере. Ферментативная реак-

ция была остановлена путем добавления в лунки 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность (ОП) реакционной жидкости определяли при 492 нм с использованием считывающего устройства (Asys Hitech GmbH, Ойгендорф, Австрия). При учете результатов ИФА была определена средняя ОП жидкости четырех лунок с опытными и контрольными образцами фекалий собак в разведениях от 1:2 до 1:16. Реакцию считали положительной, если средняя ОП реакционной жидкости опытных лунок превосходила ОП контрольных лунок не менее чем в 2 раза.

**Определение ЭС-Аг гельминта и/или КАг в образцах фекалий собак в с-ИФА по схеме: ПКА+ЭС-Аг/КАг+МКА.** Твердую фазу 96-луночного полистиролового планшета сорбировали IgG-фракцией ПКА кролика в концентрации 5 мкг/мл в БКБ (рН 9,6) и выдерживали в течение ночи на холоде (4 °С). Далее проводили пассивирование активных центров 1%-м раствором БСА (1 ч, 37 °С) и трижды промывали ЗФР (рН 7,0–7,2) и столько же ЗФР-Тв. Затем в лунках готовили отдельные серийные разведения ЭС-Аг двух цестод в ЗФР или образцов стула инвазированных собак. В контрольные лунки вносили об-

разцы фекалий, взятые до заражения животных. После инкубирования планшеты в термостате (1ч, 37 °С) и отмывки твердой фазы в лунки вносили МКА из супернатанта питательной среды и помещали в термостат на 1 ч при 37 °С. Для проявления реакций использовали козьи анти-тела против мышинового IgG (H+L), конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson Immuno Research, Уэст-Гров, США), и раствор субстрата с ТМБ. Учет результатов анализа проводили по вышеописанной схеме.

Достоверность разности между средними значениями ОП реакционной жидкости до и после заражения собак определяли с помощью общеизвестного метода Стьюдента (td-критерий).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты с-ИФА, в котором в качестве захватывающих антител были использованы МКА Egp1, имеющие специфичность к антигенам личиночной и взрослой форм эхинококка, представлены в табл. 1.

Таблица 1

#### Специфичность и чувствительность с-ИФА при использовании схемы «МКА+ЭС-Аг+ ПКА» (ОП реакционной жидкости)

#### Specific features and resistance of IEA when using the scheme «МКА+ЭС-Аг+ ПКА» (reaction fluid)

Номер лунки планшеты	Виды ЭС-Аг цестод				Концентрация ЭС-Аг в лунке, нг
	<i>E. granulosus</i>		<i>C. tenuicollis</i>	<i>T. hydatigena</i>	
	протосколексы	взрослая форма			
1	1,804	2,566	0,827	1,215	1 000,0
2	1,402	2,720	1,071	1,360	500,0
3	1,014	2,897	1,070	1,601	250,0
4	0,708	2,814	1,131	1,037	125,0
5	0,491*	2,728	1,143	1,066	60,0
6	0,290	2,028	1,188	0,685	30,0
7	0,180	1,021*	1,005	0,570	15,0
8	0,039	0,308	0,725*	0,634*	8,0
9	0,118	0,133	0,354	0,345	4,0

Примечание. 1. Средняя ОП контрольных лунок 0,193. 2. В таблице приведены средние значения ОП из трех исследований. \* Значения ОП, показывающие титры ЭС-Аг.

Как видно из табл. 1, при данной схеме постановки иммуноанализа антигены личиночной и взрослой форм обеих цестод, связавшись с захватывающими МКА, распознавались детектирующими ПКА кролика. Причем ЭС-Аг *C. tenuicollis* обнаруживался в более низких концентрациях, чем одноименный антиген протосколекса. Например, если суммарный ЭС-Аг протоско-

лекса обнаруживался до концентрации 60,0 нг/мл, то чувствительность с-ИФА в случае использования аналогичного антигена *C. tenuicollis* достигала 8,0 нг/мл.

Данная схема с-ИФА была испытана на образцах фекалий собак, экспериментально зараженных личинками эхинококка и тении гидатигенной (табл. 2).

Таблица 2

**Определение копроантигена в с-ИФА по схеме «МКА+КАг+ПКА» (ОП реакционной жидкости лунок, 492 нм)  
Coproantigenes in IEA in the scheme «МКА+КАг+ПКА» (reaction fluid in lunula, 492 nm)**

Разведения образцов фекалий экспериментально инвазированных собак	Образцы фекалий собак, взятые на 20-й день после заражения			
	<i>E. granulosus</i>	<i>T. hydatigena</i>	<i>E. granulosus</i>	<i>T. hydatigena</i>
	Номера зараженных собак			
	10	6	10	6
	МКА, использованные в качестве захватывающих антител			
	МКА Egp1	МКА Egp2	МКА Egp1	МКА Egp2
1:2	1,635	1,097	1,782	1,296
1:4	1,603	0,587	1,605	0,400
1:8	0,802	0,361	0,670	0,317
1:16	0,749	0,292	0,523	0,242
1:32	0,592	0,202	0,468	0,157
1:64	0,357	0,143	0,342	0,110
1:128	0,324	0,113	0,267	0,105
1:256	0,411	0,131	0,168	0,118
1:512	0,120	0,076	0,225	0,051
1:1024	0,157	0,052	0,110	0,033
1:2048	0,181	0,045*	0,078	0,039
1:4096	0,083*	0,041	0,060*	0,037*
1:8192	0,042	0,036	0,037	0,020
Средняя ОП образцов фекалий собак, взятых до заражения				
1:2–1:16	0,023	0,021	0,020	0,016

Примечание. В таблице приведены средние значения ОП из трех исследований.

\* Значения ОП, показывающие титры копроантигена.

Из табл. 2 следует, что использование МКА обоих штаммов гибридом в качестве первых (захватывающих) антител обеспечивает высокую чувствительность иммуноанализа при обнаружении копроантигена. Последний детектировался в фекальном материале собак, зараженных *E. granulosus* и/или *T. hydatigena*, до разведения 1:2048–1:4096.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что МКА не дают желаемых результатов в с-ИФА

при использовании их в качестве первых антител, поскольку захваченный ими антиген не позволяет дифференцировать близкородственные цестоды, паразитирующие у собак.

В следующей постановке с-ИФА антитела меняли местами, т.е. в роли захватывающих антител выступали ПКА, а детектирующими были МКА Egp1 (табл. 3).

Таблица 3

**Специфичность и чувствительность с-ИФА при использовании схемы: «ПКА+ЭС-Аг+ МКА» (ОП реакционной жидкости)**

**Specific features and resistance of IEA when using the scheme: «ПКА+ЭС-Аг+ МКА» (reaction fluid)**

Номер лунки планшеты	Виды ЭС-Аг цестод				Концентрация ЭС-Аг в лунке, нг
	<i>E. granulosus</i>		<i>C. tenuicollis</i>	<i>T. hydatigena</i>	
	протосколексы	взрослая форма			
1	2	3	4	5	6
1	0,663	0,056	0,029	0,029	1000,0
2	0,506	0,056	0,028	0,026	500,0
3	0,420	0,063	0,028	0,026	250,0
4	0,350	0,064	0,029	0,028	125,0
5	0,265	0,064	0,032	0,030	60,0
6	0,179	0,056	0,029	0,028	30,0
7	0,140	0,064	0,029	0,031	15,0
8	0,112	0,064	0,032	0,032	8,0
9	0,098	0,061	0,034	0,028	4,0

Окончание табл. 3

1	2	3	4	5	6
10	0,086	0,056	0,028	0,029	2,0
11	0,077	0,068*	0,028	0,031	1,0
12	0,076	0,030	0,029	0,030	0,5
13	0,077	0,030	0,031	0,032	0,25
14	0,058	0,030	0,030	0,031	0,125
15	0,056*	0,032	0,031	0,031	0,06
16	0,030	0,020	0,025	0,027	0,03

Примечание. 1. Средняя ОП контрольных лунок 0,027. 2. В таблице приведены средние значения ОП из трех исследований.  
\* Значения ОП, показывающие титры ЭС-Аг.

Данные табл. 3 показывают, что использованный вариант иммуноанализа не выявляет ЭС-Аг *C. tenuicollis* и *T. hydatigena*, однако обнаруживает аналогичные антигены личиночной и взрослой форм эхинококка до концентрации 0,06 и 1,0 нг/мл соответственно.

В дальнейшей работе МКА Egp1 использовались в роли детектирующих антител для выявления копроантигена, захваченного первыми антителами – IgG- фракцией ПКА кролика (табл. 4).

Таблица 4

**Обнаружение копроантигена в с-ИФА по схеме «ПКА+КАг+ МКА»**  
**Coproantigenes in IEA in the scheme «ПКА+КАг+ МКА»**

Номер собаки	Средняя ОП контрольных лунок	Средняя ОП (492 нм) лунок с образцами стула собак, взятыми в разные дни после заражения:					
		5-й	10-й	15-й	20-й	25-й	30-й
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Собаки, зараженные C. tenuicollis</i>							
6	0,112	0,328	0,118	0,217	0,158	0,192	0,153
Среднее значение ОП 0,194±0,030							
КП= 1,7; P>0,05							
7	0,100	0,104	0,193	0,095	0,118	0,082	0,135
Среднее значение ОП 0,121±0,010							
КП = 1,21; P>0,05							
<i>Собаки, зараженные протосколексами E. granulosus</i>							
11	0,090	0,493	0,385	0,438	0,368	0,704	0,502
Среднее значение ОП 0,480±0,050							
КП = 5,3; P<0,01							
12	0,087	0,446	0,249	0,384	0,339	0,663	0,592
Среднее значение ОП 0,450±0,060							
t = 5,1; P<0,01							
13	0,137	0,474	0,299	0,293	0,243	0,384	0,727
Среднее значение ОП 0,400±0,070							
КП = 2,9; P<0,05							
14	0,069	0,693	0,292	0,488	0,557	0,410	0,779
Среднее значение ОП 0,540±0,070							
КП = 7,8; P<0,01							
15	0,065	0,462	0,398	0,215	0,268	0,316	0,583
Среднее значение ОП 0,370±0,050							
КП = 5,7; P<0,01							
8	0,083	0,279	0,686	0,353	0,600	0,284	0,330
Среднее значение ОП 0,420±0,070							
КП = 5,1; P<0,01							

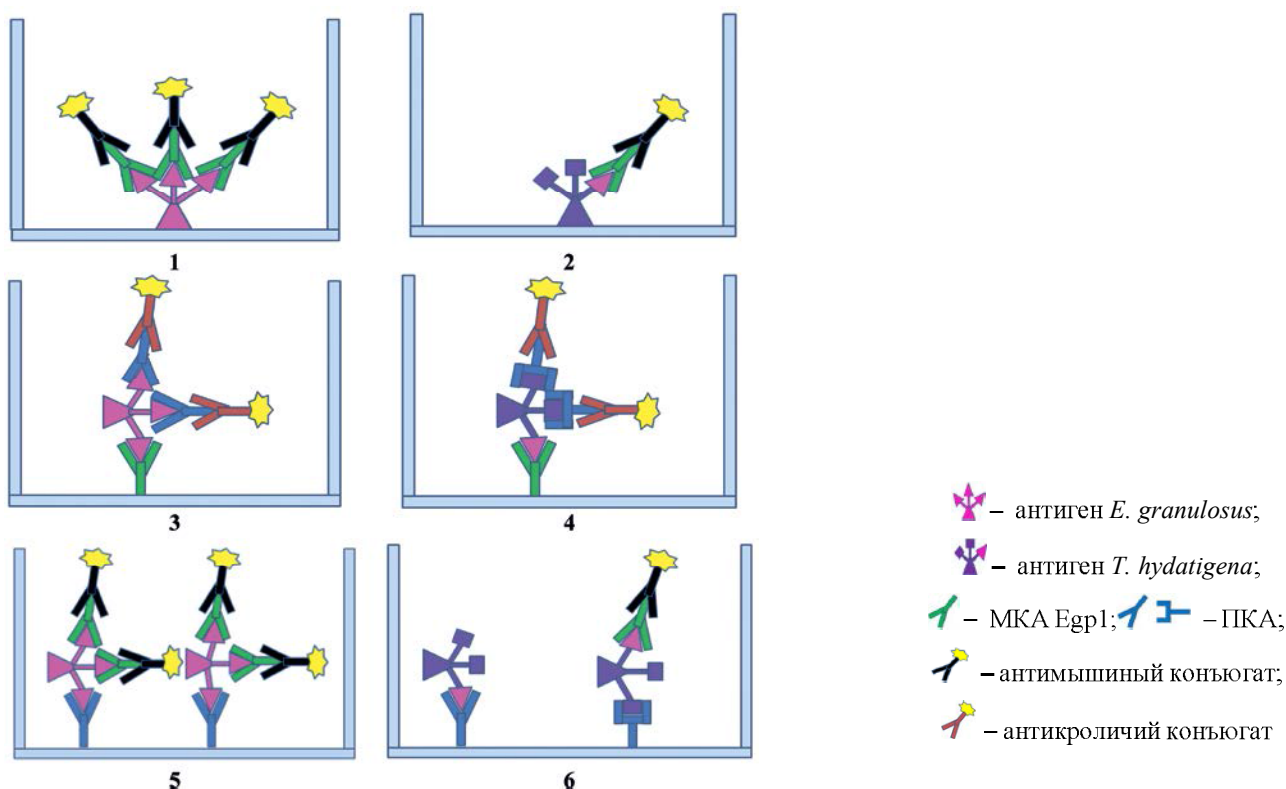
1	2	3	4	5	6	7	8
9	0,092	0,193	0,202	0,247	0,362	0,299	0,256
		Среднее значение ОП 0,260±0,020 КП = 2,82; P<0,05					
10	0,070	0,488	0,347	0,408	0,211	0,361	0,241
		Среднее значение ОП 0,340±0,040 КП = 4,9; P<0,01					

Примечание. КП – кратность превышения средней ОП опытных лунок над средней ОП контрольных лунок.

Данная постановка с-ИФА существенно повысила специфичность анализа. Так, например, положительная реакция на копроантиген при анализе фекалий собаки № 6, инвазированной *S. tenuicollis*, установлена только на 5-й день после заражения (ОП 0,328 против 0,112 до заражения), тогда как у собак, зараженных протосколексами эхинококка, позитивные результаты отмечались во всех периодах исследования. У собак № 6 и № 7, зараженных цистицерками, достоверного увеличения ОП по сравнению с показателями экстинкции до инвазирования не отмечалось (КП=1,7 при P>0,05; КП=0,7 при P>0,05 соответственно), тогда как в группе собак, зараженных личинками эхинококка, среднее значение ОП существенно повысилось в ходе развития инвазионного процесса. Так, у собак № 9 и № 13 ОП после заражения достоверно увеличилась в 2,8–2,9 раза (P<0,05), а у их аналогов

№ 8, 10, 11, 12, 15 – в 4,9–5,7 раза (P<0,01). Весьма существенное повышение ОП к 30-му дню эксперимента (в 7,8 раза) установлено у собаки № 14.

Таким образом, МКА Egp1, имеющие выраженную активность в н-ИФА против ЭС-Аг эхинококка, в с-ИФА оказались непригодными в качестве захватывающих антител, поскольку они вступали в перекрестную реакцию с ЭС-Аг цистицеркуса, имеющего сходные эпитопы с протосколексами. Однако с-ИФА приобретает способность дифференцировать антигены двух близкородственных цестод при замене местами двух видов антител. На наш взгляд, зависимость специфичности МКА от вариантов постановки ИФА свидетельствует о наличии в структуре ЭС-Аг близкородственных цестод сходного (ых) эпитопа (ов) с различной плотностью расположения (рисунок).



Различия в антигенном строении ЭС-Аг двух близкородственных цестод *E. granulosus* и *T. hydatigena*  
Differences in antigene structure of ЭС-Аг of two closely related gid tapeworms *E. granulosus* and *T. hydatigena*

Как было отмечено в разделе «Объекты и методы исследований», МКА в н-ИФА проявляют более высокую активность по отношению к ЭС-Аг протосколекса, нежели к аналогичному антигену *S. tenuicolis* (позиции 1 и 2 на рисунке). Мы полагаем, что плотность эпитопов, родственных к использованному МКА, значительно выше у ЭС-Аг протосколекса, чем у одноименного антигена цистицеркуса, что и позволяет различать их в н-ИФА. При постановке с-ИФА по схеме «МКА+ЭС-Аг/КАг+ПКА» блокируется лишь эпитоп, специфичный к МКА и имеющийся в составе антигенов обеих цестод (позиции 3 и 4 на рисунке). Такой иммунный комплекс будет обнаруживаться ПКА кролика за счет других детерминант антигена. Однако если заменить антитела местами и провести с-ИФА по схеме «ПКА+ЭС-Аг/КАг+МКА», то количество эпитопов, узнаваемых МКА, будет значительно больше в структуре ЭС-Аг протосколекса, нежели в одноименном антигене цистицеркуса (позиции 5 и 6 на рисунке). Следовательно, с-ИФА дифференцирует антигены двух близкородственных гельминтов за счет имеющегося между ними различия по плотности расположения эпитопов, специфичных для МКА.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан с-ИФА для прижизненной диагностики эхинококкоза собак, основанный на обнаружении копроантигена с помощью кроличьих поликлональных (захватывающих) и мышинных моноклональных (детектирующих) антител.

2. Предлагаемый иммунологический метод диагностики эхинококкоза собак позволяет дифференцировать копроантигены двух близкородственных цестод: *E. granulosus* и *T. hydatigena*. Дифференциальный диагноз достигается за счет относительно высокой плотности эпитопов МКА в структуре ЭС-Аг эхинококка.

3. Копроантиген эхинококка обнаруживается в образцах фекалий собак на 5-й день после заражения и детектируется до 30-го дня эксперимента (время наблюдения). Для использования с-ИФА в диагностике эхинококкоза необходимо установить продолжительность элиминации копроантигена после дегельминтизации, что позволит определить сроки повторного исследования собак с целью подтверждения освобождения организма от паразита.

Работа выполнена в рамках проекта № 0177/ГФ4 «Копро-ИФА для диагностики эхинококкоза собак» бюджетной программы 217 Министерства образования и науки Республики Казахстан на 2015–2017 гг.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Shaikenov B. Sh., Torgerson P. R. Changes in the epidemiology of echinococcosis in Kazakhstan // *Echinococcosis in Central Asia: Problems and Solutions* / Edited by P. Torgerson and B. Shaikenov. – Zurich; Almaty: Publishing house «Dauir», 2004. – P. 3–12.
2. Mathis A., Deplazes P. Diagnosis of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* in animals and identification in environmental samples // *Ibid.* – P. 149–158.
3. Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory/secretory products of adult *Echinococcus granulosus*, and their application to coproantigen detection / C. Casaravilla, R. Malgor, A. Rossi [et al.] // *Parasitol. Int.* – 2005. – Vol. 54. – P. 43–49.
4. Coproantigens detection for the diagnosis of canine Echinococcosis in the border area of La Quiaca-Villazón / N. Casas, S. Costas Otero, G. Céspedes [et al.] // *Rev. Argent. Microbiol.* – 2013. – Vol. 45, N 3. – P. 154–159.
5. Kuru B. B., Aypak S., Aysul N. Prevalence of *Echinococcus granulosus* determined with polymerase chain reaction in dogs in Aydın district // *Turkiye Parazitol. Derg.* – 2013. – Vol. 37, N 2. – P. 78–83.
6. A comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with other surveillance tools for *Echinococcus granulosus* diagnosis in canine definitive hosts / X. W. Ni, D. P. McManus, Z. Z. Lou [et al.] // *PLoS One*. 2014. Jul 9;9 (7): e100877. doi: 10.1371 / journal.pone.0100877. e Collection 2014.
7. Monoclonal Antibody-Based Copro-ELISA Kit for Canine Echinococcosis to Support the PAHO Effort for Hydatid Disease Control in South America / N. Morel, G. Lassabe, S. Elola [et al.] // *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7 (1): e 1967. doi: 10.1371 / journal. pntd.0001967. Epub 2013 Jan 10.

8. Easy and Efficient Method for Native and Immunoreactive *Echinococcus granulosus* Antigen 5 Enrichment from Hydatid Cyst Fluid / D. Pagnozzi, G. Biosa, M. F. Addis [et al.] // PLoS One. 2014 Aug 13; 9 (8): e104962. doi: 10.1371/journal.pone.0104962. eCollection 2014.
9. Characterization of excretory-secretory products from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis / D. Carmena, J. Martínez, A. Benito, J. A. Guisantes // Parasitology. – 2004. – Vol. 129, N 3. – P. 371–388.
10. Копро-ИФА для диагностики эхинококкоза собак: отчет о НИР (промежуточный) / АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина»: рук. А.К. Булашев; исполн. О.С. Акибеков. – Астана, 2015. – 62 с. – № ГР 0: 0115РК00470. – Инв. № 0215РК02092.
11. Bulashev A., Akibekov O., Abulgazimova G. Development and Evaluation of ELISA for Diagnosis of Cystic Echinococcosis // Proceedings of Seoul International Conference on Biological Engineering & Natural Science. – Seoul, South Korea, 27–29 June 2015. – Seoul, 2015. – P. 318–319.
12. Smyth J.D, Davies Z. In vitro culture of the strobilar state of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): a review of basic problems and results // Int. J. Parasitol. – 1974. – Vol. 4. – P. 631–644.
13. Howel M.J. Cultivation of *Echinococcus* species in vitro // RCA Thompson, The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease. – London: George Allen & Unwin, 1986. – P. 143–163.

REFERENCES

1. Shaikenov B. Sh., Torgerson P.R. Changes in the epidemiology of echinococcosis in Kazakhstan. *Echinococcosis in Central Asia: Problems and Solutions*. Edited by P. Torgerson and B. Shaikenov. Zurich; Almaty: Publishing house «Daur», 2004. pp. 3–12.
2. Mathis A., Deplazes P. Diagnosis of *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* in animals and identification in environmental samples. *Ibid.* pp. 149–158.
3. 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. *Parasitol. Int.*, Vol. 54 (2005): 43–49.
4. Casas N., Costas Otero S., Céspedes G. et al. Coproantigen detection for the diagnosis of canine Echinococcosis in the border area of La Quiaca-Villazón. *Rev. Argent. Microbiol.*, Vol. 45, no. 3 (2013): 154–159.
5. Kuru B. B., Aypak S., Aysul N. Prevalence of *Echinococcus granulosus* determined with polymerase chain reaction in dogs in Aydın district. *Turkiye Parazit. Derg.*, Vol. 37, no. 2 (2013): 78–83.
6. Ni X.W., McManus D.P., Lou Z.Z. et al. A comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with other surveillance tools for *Echinococcus granulosus* diagnosis in canine definitive hosts. *PLoS One*. 2014. Jul 9; 9 (7): e100877. doi: 10.1371/journal.pone.0100877. eCollection 2014.
7. Morel N., Lassabe G., Elola S. et al. Monoclonal Antibody-Based Copro-ELISA Kit for Canine Echinococcosis to Support the PAHO Effort for Hydatid Disease Control in South America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7 (1): e1967. doi: 10.1371/journal.pntd.0001967. Epub 2013 Jan 10.
8. Pagnozzi D., Biosa G., Addis M.F. et al. 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.
9. 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*, Vol. 129, no. 3 (2004): 371–388.
10. Копро-ИФА для диагностики эхинококкоза собак: отчет о НИР (промежуточный) [Research report]. АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина»: рук. А.К. Булашев; исполн. О.С. Акибеков. Астана, 2015. 62 с. № ГР 0: 0115РК00470. Инв. № 0215РК02092.
11. Bulashev A., Akibekov O., Abulgazimova G. Development and Evaluation of ELISA for Diagnosis of Cystic Echinococcosis. *Proceedings of Seoul International Conference on Biological Engineering & Natural Science*. Seoul, 2015. pp. 318–319.
12. Smyth J.D, Davies Z. In vitro culture of the strobilar state of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): a review of basic problems and results. *Int. J. Parasitol.*, Vol. 4 (1974): 631–644.
13. Howel M.J. Cultivation of *Echinococcus* species in vitro. *RCA Thompson, The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*, London: George Allen & Unwin, 1986. pp. 143–163.