

в сторону уменьшения нормальной микрофлоры (особенно со стороны бифидобактерий, лактобацилл и кишечных палочек). Вместе с тем, увеличилось содержание аэробных грамотрицательных палочек (род *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*), появляются лактозонегативные штаммы *E. coli*, повышается содержание стафилококков и стрептококков. Микромицеты (род *Candida*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*) также регистрируются в большем количестве.

Следует отметить, что при паразитировании *Dipylidium caninum* наблюдается максимальное (по сравнению с другими паразитами) количество клостридий, при паразитировании эймерий (как в моноинвазии, так и в ассоциации с другими паразитами) - максимальное количество стафилококков и стрептококков, а также грибов рода *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Заключение. Вышеизложенные результаты и их анализ позволяют сформулировать следующие выводы:

1. При моноинвазиях и ассоциативных паразитозах собак, вызванных *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Dipylidium caninum*, *Uncinaria stenocephala*, *Isospora ohioensis*, *Isospora canis* и *Eimeria canis* в кишечнике больных животных резко меняется количественный и качественный состав микрофлоры, интенсивность изменения которой находится в прямой зависимости от интенсивности инвазии и наличия сопутствующих инвазий. При смешанных паразитозах состав микрофлоры кишечника нарушается в большей степени, чем при моноинвазии.

2. Изменение количественного и качественного состава микрофлоры тонкого и толстого кишечника у инвазированных собак по сравнению с показателями здоровых животных происходит в сторону уменьшения на 2-4 порядка нормальной микрофлоры кишечника (бифидобактерий - до 10^5 - 10^6 КОЕ/г, лактобактерий - до 10^4 - 10^5 КОЕ/г), тогда как увеличивается содержание транзитных микроорганизмов: аэробных бацилл, микромицет (дрожжевых и плесневых грибов) - до 10^4 - 10^5 КОЕ/г, а также выделяются: протей в количестве до 10^4 КОЕ/г, клостридии - до 10^5 - 10^7 КОЕ/г, стрептококки - до 10^5 КОЕ/г, стафилококки - до 10^4 - 10^5 КОЕ/г.

3. Отмеченные изменения в составе микрофлоры желудочно-кишечного тракта собак, больных моноинвазиями и ассоциативными паразитозами, характерны для дисбактериоза.

Литература. 1. Горковенко Н.Е. Количественная оценка кишечного микробиоценоза телят / Н.Е. Горковенко, Ю.А. Макаров, А.М. Кузьменко // Труды ВИЭВ/ - Том 75. - С. 176-177. 2. Красноголовец, В.Н. Дисбактериоз кишечника / В.Н. Красноголовец. - М.: Медицина, 1989. - 208 с. 3. Нормобиоценоз и дисбактериоз молодняка / Г.Ф. Бовкун [и др.] // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2008. - №3. - С. 12-17. 4. Пинегин, В.В. Дисбактериозы кишечника / Пинегин, В.В., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. - Москва, 1984. - 211 с. 5. Субботин, В.В. Микрофлора кишечника собак: физиологическое значение, возрастная динамика, дисбактериозы, коррекция / В.В. Субботин, Н.В. Данилевская // Ветеринар. - №1. - 2002. - С. 12-23. 6. Тимошко, М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных / М.А. Тимошко. - Кишинев, Штиинца, 1990. - 190 с. 7. Luckey T.D. Overview of gastrointestinal microecology. // Die Nahrung. - Vol. 31. - № 5-6. - 1987.

УДК: 619:616.995.122.21-074

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ АНТИГЕНОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ИММУНОДИАГНОСТИКИ ФАСЦИОЛЕЗА

Трус И.А., Якубовский М.В.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,
г. Минск, Республика Беларусь

Полученные нами антигены обладают высокой специфичностью и пригодны для использования в иммунодиагностике фасциолеза. Результаты позволяют утверждать, что использование ИФА и РИД при постановке диагноза на фасциолез у крупного рогатого скота исключает ложноположительные реакции, вызванные туберкулезом или гиподерматозом ($p < 0,001$).

Received antigens possess highly specificity and suitably for use in fascioliasis immunodiagnostics. It is shown that use of ELISA and GDPT at fascioliasis immunodiagnostics in cattle excludes false positive results caused by tuberculosis and hypodermatosis ($p < 0,001$).

Введение. Иммунологическая перестройка в патогенезе инвазированного организма имеет первостепенное значение [13]. Гельминты и выделяемые ими продукты жизнедеятельности несут антигенные свойства. Под воздействием этих антигенов в организме происходит ряд ответных иммунных процессов и мобилизация защитных механизмов при регулирующей роли нервной системы: воспаление, аллергические реакции быстрого и замедленного типа, изменение функционирования Т- и В-лимфоцитарных систем, активация макрофагов, эозинофилия, фагоцитоз. Происходит сенсибилизация организма и образуются антитела - иммуноглобулины G, A, M и E. Срок и количество их в крови животного зависит от напряженности иммунитета, интенсивности инвазии, стадии развития паразита, условий кормления и содержания животного, пола, возраста, физиологического состояния, наличия других болезней и т.д. [9, 13].

Методы иммунодиагностики базируются на установлении изменений, развившихся в организме хозяина при его контакте с паразитом. В связи с тем, что существующие прижизненные, посмертные и другие методы не всегда позволяют точно выявить наличие в организме инвазионного заболевания, во многих странах мира ведутся работы по разработке высокоэффективных иммунологических методов их диагностики [2].

В последнее время наибольшее внимание уделяется другим методам, обладающим возможностью более высокого уровня диагностики болезней. К ним относятся РИА, ИФА, РИФ, ПЦР. Многократное усиление реакций является ценным качеством при диагностике паразитарных болезней, так как они не отличаются высоким уровнем специфических антител [2, 3].

Использование ИФА в паразитологии началось с 1975 года и до настоящего времени интерес к этой реакции и ее модификациям не ослабевает. Пригодность ИФА была апробирована для диагностики многих гельминтозов [3]. Проведенные рядом авторов исследования выявили большое количество специфических белков, применимых для диагностики фасциолеза [15].

Антигены гельминтов обнаруживаются в больших количествах в местах их локализации, тем не менее обнаружение их в кровеносном русле затруднительно. Сложность обнаружения антигенов в русле крови связывают с их значительным «разбавлением» и элиминацией антителами [6]. Многими исследователями поднимается вопрос родства антигенного состава фасциол и микобактерий, вызывающих туберкулез. На роль неспецифических реакций на туберкулин у животных, инвазированных фасциолами, обратил внимание М.А. Бабьянскас. Наибольшее количество неспецифических реакций выявлено им при эктопической локализации трематод в легких [1]. Взаимодействие сенсibilизированных лимфоцитов животных с антигенами микобактерий обеспечивает реакцию на туберкулин, являющуюся специфической для микроорганизмов этого рода. По мнению А.Н. Дерина и соавт. (2007), у инвазированных гельминтами животных реакция на туберкулин возможна лишь при заражении возбудителем туберкулеза [4].

В 1969 г. А.М.А. El-Ahwal установил, что мигрирующие адолескарии фасциол лишь создают путь для проникновения атипичных микобактерий, которые, размножаясь, могут проявлять аллергизирующий эффект. Белки же фасциол не играют заметной роли в сенсibilизации животных к туберкулину [4]. В работах А.М.А. El-Ahwal (1969) R. Brito (1979), A. Belloli (1995), А.Н. Дерина и соавт. (2007) показано, что предварительные противопаразитарные обработки закономерно уменьшали число выявляемых неспецифических реакций у животных на туберкулин [4, 11]. Возможно, что паразитирование фасциол увеличивает вероятность выявления животных при использовании туберкулиновой пробы. Из приведенных данных можно сделать важный вывод для практических врачей: перед диагностикой туберкулеза, равно как и перед вакцинациями, следует провести дегельминтизацию животных против гельминтов, в том числе и фасциолеза [7, 8].

В ряде исследований получены данные о том, что иммунологические реакции при фасциолезе обладают высокой чувствительностью, но отмечены и случаи кроссреакций при шистосомозах, описторхозе [1, 10, 12, 14]. Существование кроссреакций затрудняет диагностику фасциолеза. Возможным способом устранения ошибки, вносимой ими, является конструирование более совершенных диагностических тест-систем. Проведен ряд исследований по изучению антигенного состава трематоды *F. hepatica* в иммунном ответе, но до сих пор нет единого мнения по поводу выбора оптимального антигена для диагностики фасциолеза. Таким образом, выбор антигена является ключевым при проведении иммунодиагностики фасциолеза. Совершенствование серологической диагностики включает в себя улучшение применяемых антигенов путем их дальнейшей очистки и изучения их антигенных свойств.

Целью нашей работы являлась разработка высокоэффективных антигенов для ранней иммунодиагностики фасциолеза крупного рогатого скота и изучение их основных свойств.

Материалы и методы исследований. Для получения антигенов живых фасциол собирали из желчных протоков печени спонтанно инвазированного фасциолами крупного рогатого скота на мясокомбинатах Минска, Витебска, Слонима. Во всех случаях, используя морфометрический анализ, был определен вид *F. hepatica*. Нами были получены 2 серии антигенов из трематоды *F. hepatica*: соматические и экскреторно-секреторные. Для получения соматических антигенов фасциолы (СА) отмывали и механически гомогенизировали их. В дальнейшем использовали надосадочную жидкость, содержащую растворимые белки. Для приготовления экскреторно-секреторных антигенов фасциол (ЭСА) живых фасциол отмывали, доставляли с мясокомбината в термосе (при температуре 37-39 °С), содержащем буферный раствор. Инкубировали в термостате. Выживаемость составила 70%, что свидетельствует о высокой переживаемости фасциол. После этого перемешивали, осаждали трематод и отделяли раствор. Полученный супернатант центрифугировали.

Для получения гипериммунных сывороток проводили гипериммунизацию кроликов и телят по методике, описанной Axelsen et al. (1974). Для иммунизации использовали как соматические, так и экскреторно-секреторные антигены фасциол. При проведении иммунизации животных каждую неделю проводили отбор сыворотки. Полученные пробы исследовали в РИД для установления уровня специфических антител в крови животных. Окончательный отбор сыворотки провели через 7 недель после начала иммунизации животных.

Видовую специфичность проверяли методом анафилактики на морских свинках. Для этого были сформированы опытные и контрольная группы численностью по 5 морских свинок. Животных вначале сенсibilизировали малыми дозами (0,25 см³) антигенов. Спустя 19 дней свинкам вводили внутрисердечно разрешающие дозы (по 2 см³) гомологичных и гетерологичных антигенов. После введения препаратов за животными велось наблюдение.

Реакцию иммунодиффузии (РИД) ставили в 1% агаре, приготовленном на физиологическом растворе с добавлением 3% ПЭГ. Пластинки инкубировали при 18-25 °С 3-5 суток в эксикаторе, содержащем раствор фенола. Результаты реакции учитывали в косо проходящем свете, используя ОИ-19. При необходимости гель последовательно отмывали физиологическим раствором, дистиллированной водой, высушивали, окрашивали раствором амидошварца, обесцвечивали фон раствором уксусной кислоты. Постановку ИФА проводили в непрямой твердофазной модификации [5].

Результаты исследований. Видовую специфичность проверяли методом анафилактики на морских свинках. При введении разрешающих доз гомологичных антигенов у свинок развивались типичные явления анафилактического шока. При введении гетерологичных антигенов (туберкулин, антиген из личинок подкожного овода) и физиологического раствора реакции анафилактики не наблюдались, что свидетельствует о том, что приготовленные соматический и экскреторно-секреторный антигены являются специфичными (таблица 1).

При использовании РИД нами было установлено, что чувствительность данного метода не позволяет выявить взаимодействие гипериммунных сывороток кроликов и телят с белками, входящими в состав *Mycobacterium bovis*, *Hydroderma bovis*, сывороток или печени крупного рогатого скота свободного от фасциол.

Таблица 1 – Определение специфичности антигенов фасциол с использованием реакции анафилактики на морских свинок

Сенсибилизирующий антиген из фасциол	Разрешающий препарат			
	Соматический антиген	Экскреторно-секреторный антиген	Антиген из личинок подкожного овода	Туберкулин
	Степень проявления реакции анафилактики			
Соматический антиген	+++	++	—	—
Экскреторно-секреторный антиген	+	+++	—	—
Отрицательный контроль	—	—	—	—

Примечание: «+++» – гибель в течение 5 минут; «++» – гибель в течение 1 часа; «+» – возбуждение, гипертермия, тахикардия; «—» – отсутствие реакции.

С этой целью использовали различные очищенные туберкулины, дезинтеграты *Mycobacterium bovis*, белковый раствор антигена *Hydroderma bovis*, гомогенизированные кусочки печени крупного рогатого скота, больного фасциолезом и свободного от фасциол. Позднее сходные данные были получены и с использованием ИФА (таблица 2, таблица 3).

Таблица 2 – Специфичность антигенов фасциол при использовании РИД

Проявляющий компонент	Исследуемый антиген	Среднее значение \log_2 титра антител
Гипериммунная кроличья сыворотка к соматическому антигену <i>F. hepatica</i>	Соматический антиген	6***
	Экскреторно-секреторный антиген	4***
	Гиподерматозный антиген	—
	Белок печени здоровых коров	—
	Белок печени спонтанно инвазированных фасциолезом коров	—
	Протоплазматический дезинтеграт <i>Mycobacterium bovis</i>	—
	Очищенный туберкулин для млекопитающих	—
	Физиологический раствор (контроль)	—
Гипериммунная кроличья сыворотка к экскреторно-секреторному антигену <i>F. hepatica</i>	Соматический антиген	4***
	Экскреторно-секреторный антиген	5***
	Гиподерматозный антиген	—
	Белок печени здоровых коров	—
	Белок печени спонтанно инвазированных фасциолезом коров	—
	Протоплазматический дезинтеграт <i>Mycobacterium bovis</i>	—
	Очищенный туберкулин для млекопитающих	—
	Физиологический раствор (контроль)	—
Гипериммунная кроличья сыворотка к протоплазматическому дезинтеграту <i>Mycobacterium bovis</i>	Соматический антиген	—
	Экскреторно-секреторный антиген	—
	Протоплазматический дезинтеграт <i>Mycobacterium bovis</i>	4***
	Очищенный туберкулин для млекопитающих	2***
	Физиологический раствор (контроль)	—
Гипериммунная кроличья сыворотка к соматическому антигену <i>Hydroderma bovis</i>	Соматический антиген	—
	Экскреторно-секреторный антиген	—
	Гиподерматозный антиген	5***
	Физиологический раствор (контроль)	—
Нормальная кроличья сыворотка (контроль)	Соматический антиген	—
	Экскреторно-секреторный антиген	—
	Физиологический раствор (контроль)	—

Примечание: «—» – отсутствие реакции; *** – $p < 0,001$

Таблица 3 – Специфичность антигенов фасциол при использовании ИФА

Проявляющий компонент	Исследуемый антиген	Среднее превышение оптической плотности (\bar{S}/\bar{N})
Гипериммунная бовиная сыворотка к соматическому антигену <i>F. hepatica</i>	Соматический антиген	5,47***
	Экскреторно-секреторный антиген	6,24***
	Гиподерматозный антиген	1,12
	Протоплазматический дезинтеграт <i>Mycobacterium bovis</i>	1,07
	Очищенный туберкулин для млекопитающих	1,03

Продолжение таблицы 3

Гипериммунная бовиная сыворотка к соматическому антигену <i>F. hepatica</i>	Белок печени здоровых коров	1,01
	Белок печени спонтанно инвазированных фасциолезом коров	1,08
	Физиологический раствор (контроль)	0,82
Гипериммунная бовиная сыворотка к экскреторно-секреторному антигену <i>F. hepatica</i>	Соматический антиген	4,29***
	Экскреторно-секреторный антиген	3,47***
	Гиподерматозный антиген	1,09
	Протоплазматический дезинтеграт <i>Mycobacterium bovis</i>	1,03
	Очищенный туберкулин для млекопитающих	0,95
	Белок печени здоровых коров	1,04
	Белок печени спонтанно инвазированных фасциолезом коров	1,06
	Физиологический раствор (контроль)	0,85
Нормальная кроличья сыворотка (контроль)	Соматический антиген	1,12
	Экскреторно-секреторный антиген	1,17
	Физиологический раствор (контроль)	1,29

Примечание: *** – $p < 0,001$

Гомогенаты печени больного фасциолезом и свободного от фасциол крупного рогатого скота не проявили антигенного взаимодействия с полученными гипериммунными сыворотками при исследовании их свойств с использованием РИД и ИФА. Таким образом, полученные данные указывают на невозможность использования печеней крупного рогатого скота для наработки антигена для диагностики фасциолеза, а также на то, что при гипериммунизации животных белками *F. hepatica* не происходило сенсibilизации белками печени больных животных.

Заключение. Полученные нами данные свидетельствуют о специфичности как соматического, так и экскреторно-секреторного антигенов *F. hepatica* для иммунодиагностики фасциолеза.

Результаты позволяют утверждать, что использование ИФА и РИД при постановке диагноза на фасциолез у крупного рогатого скота исключает ложноположительные реакции, вызванные туберкулезом или гиподерматозом ($p < 0,001$).

Полученные экспериментальные результаты могут быть использованы в дальнейшем для совершенствования иммунодиагностики фасциолеза и других паразитозов.

Литература. 1. Бабянскас, М.А. Иммунологическая диагностика фасциолеза и разработка методов оздоровления сельскохозяйственных животных от этой инвазии в условиях Литовской ССР: дис. ... док. вет. наук. / М.А. Бабянскас. – Кайшиядорис, 1965. – 619 с. 2. Бекиш, О.-Я.Л. Основы медицинской паразитологии / О.-Я.Л. Бекиш, В.Я. Бекиш. – Минск: Университетское, 2001. – 224 с. 3. Бережко, В.К. Иммунологические методы диагностики гельминтозов животных (краткий обзор) / В.К. Бережко // Труды Всесоюзного института гельминтологии им. академика К.И. Скрябина. – М., 2000. – Том 36. – С. 10-26. 5. Вероятность неспецифических реакций на туберкулин на фоне инвазионных болезней / А.Н. Деринев [и др.] // Ветеринария. – 2007. – № 4. – С. 22-24. 4. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля, пер. с нем. А.П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 472 с. 6. Клименко, В.В. Иммунохимический анализ антигенов гельминтов, способы их получения и перспективы практического использования / В.В. Клименко // Труды Всесоюзного института гельминтологии им. академика К.И. Скрябина. – М., 2002. – Том 38. – С. 78-130. 7. Некоторые данные по патогенезу паразитозов свиней при вакцинации их против болезни Ауески / М.В. Якубовский [и др.] // Ветеринарная наука – производству: сб. науч. тр. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». – Минск, 1983. – С. 76-82. 8. Якубовский, М.В. Влияние паразитозов свиней на поствакцинальный иммунитет против рожи и болезни Ауески / М.В. Якубовский, В.Т. Сакович // Ветеринарная наука – производству: сб. науч. тр. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». – Минск, 1983. – С. 70-75. 9. Якубовский, М.В. Диагностика, терапия и профилактика паразитарных болезней животных / М.В. Якубовский, Н.Ф. Карасев. – Минск: Хата, 2001. – 384 с. 10. Fascioliasis / J. Richter [et al.] // Current Treatment Options in Inf. Dis. – 2002. – Vol. 4. – P.313-317. 11. Interference of bovine *Fasciola hepatica* on the tuberculin intradermal test reaction / A. Belloli [et al.] // *Equine Practitioner*. – 1995. – Vol. 29. – P. 141-142. 12. Maule, A.G. Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology / ed. A.G. Maule, N.J. Marks. – Biddles Ltd, 2006. – 448 p. 13. Muller, R. Worms and human disease / R. Muller, D. Wakelin. – 2 ed. – CABI Publishing, 2002. – 300 p. 14. Principles and Practice of Clinical Parasitology / ed. S. Gillespie, R.D. Pearson. – John Wiley & Sons Ltd, 2001. – 670 p. 15. Rivera Marrero, C.A. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica* / C.A. Rivera Marrero, N. Santiago, G.V. Hillyer // *J. Parasitol.* – 1988. – Vol. 74. – P. 646-652.