

На правах рукописи



ГЛАМАЗДИН ИГОРЬ ГЕННАДЬЕВИЧ

**ЦИСТИЦЕРКОЗЫ ЖВАЧНЫХ И СВИНЕЙ,
ТЕНИИДОЗЫ ПЛОТОЯДНЫХ**
(физико-химическая характеристика антигенов возбудителей,
иммуногенез и принципы иммунодиагностики)

**16.00.03 - Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология**
03.00.19 - Паразитология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

МОСКВА 2005

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего и профессионального образования «Московский государственный университет прикладной биотехнологии» на кафедре инфекционных и паразитарных болезней животных

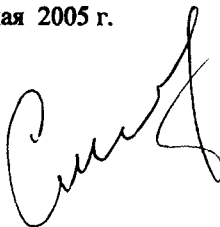
- Научный руководитель:** – доктор ветеринарных наук, профессор
Косминков Н.Е.
- Официальные оппоненты:**
- доктор ветеринарных наук, профессор
Субботин В.В.
 - доктор ветеринарных наук
Курочкина К.Г.
 - доктор ветеринарных наук, профессор
Абрамов В.Е.
- Ведущая организация:** **Ивановская государственная сельскохозяйственная академия.**

Защита диссертации состоится 10 июня 2005 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.149.03 в Московском государственном университете прикладной биотехнологии по адресу: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 33.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУПБ.

Автореферат разослан 5 мая 2005 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук



Смирнова И.Р.

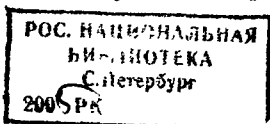
2005-4
45492

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Стремительное развитие научно-прикладных направлений иммунологии и молекулярной биологии оказывает мощное влияние на методологические подходы к изучению паразито-хозяйинных отношений при тканевых гельминтозах и разработку методов их диагностики. В настоящее время в научной литературе собрано значительное количество экспериментальных фактов, которые отражают аспекты иммунной реакции хозяина на антигены цистицерков. Сложность антигенной структуры метацестод и тений усугубляется наличием в них компонентов, перекрестно реагирующих с антигенами хозяина (В.К. Бережко, 2003; А.С. Бессонов, 2004; В.В. Клименко, 2004; А.Ито, 2003). Разностороннее изучение белковых компонентов цистицерков, их половозрелых форм в онтогенезе современными аналитическими методами является необходимым условием для уточнения механизмов влияния гельминтов на иммунологическую перестройку хозяина. Анализ антителогенеза при цистицеркозах разных видов животных современными иммунохимическими методами позволяет определить принципиальные подходы к иммунодиагностике и оказывается необходимым для обоснования применения конкретных тест-систем. Создание эффективных диагностикумов является важнейшей практической задачей ветеринарии и медицины (А.В.Успенский, 2003; М. Fisher, 1989; J.C.Allan, 2003; P. Doty, 2003).

Характеристика методов очистки диагностических антигенов гельминтов необходима для разработки иммунохимических тестов. Технология получения диагностически ценных метаболитов клеточной культуры цестод является примером быстрого внедрения науки в практику и продолжением развития фундаментальных исследований на качественно новом уровне.

В настоящее время иммунитет при паразитарных болезнях часто определяется как состояние "адаптационной толерантности", проявляющееся развитием защитных реакций в организме хозяина без полного уничтожения всех особей паразита (А.С. Бессонов, 2004; М. Sealey, L. Ortiz-Ortiz, 1982; С. Arme, 1988). Однако еще недостаточно изучены особенности молекулярных и клеточных процессов, протекающих при цистицеркозах в ходе развития инвазии. Очень слабо изученными являются вопросы включения различных звеньев иммунитета в процессе онтогенеза метацестод, их способность нейтрализовать возможные нарушения гомеостаза хозяина. Многие проявления иммунитета имеют универсальное значение. С другой стороны, часто отмечается специфика защитных реакций хозяина, связанная со своеобразием характера взаимоотношений в системе "паразит-хозяин" при гельминтозах. Огромное значение в эффективности и агрессивности иммунных реакций имеет степень взаимной адаптации двух изначально антагонистических организмов (В.К. Бережко, 1994; Э.Х. Даугалиева, 1998; С.А. Беэр, 2003; К.Г. Курочкина, 2003; О.И. Мамыкова, 2004; К. Tackmann, 1994). Поэтому изучение влияния модели цистицеркозной инвазии на факторы естественной резистентности и иммуноморфологические характеристики клеток, органы иммуногенеза при спонтанных и эксперимен-



тальных инвазиях животных реализуют диалектические подходы к уточнению паразито-хозяйных отношений.

Современные методы иммунохимического анализа позволяют использовать для диагностики инфекционных и паразитарных болезней как поли-, так и моноклональные антитела (Ю.Н. Федоров, О.А. Верховский, 1998; С.Н. Белозеров 2000; Э.А. Гаева, 2000; Р.Т. Маннапова 2003; Л.А. Написанова 2004; E. Draelants, 1994; Van Kerckhoven 1997). Разработка корректной иммунологической диагностики в ситуации, когда заболевание вызвано близкородственными цистицерками и тениями, предполагает создание родоспецифических тест-систем. Решение данной проблемы приведет к своевременному выявлению гельминтозов, а также обеспечит биологическую безопасность окружающей среды и мясопродуктов.

Цель работы – разработать теоретические положения развития адаптивно-приобретенного (вторично-исходного) равновесия в системе паразит-хозяин при цистицеркозах. Провести анализ физико-химических характеристик антигенов, гуморального и клеточного иммунного ответа при онтогенезе паразита в промежуточном и дефинитивном хозяине, научно обосновать применение тест-систем для иммунодиагностики цистицеркозов и тениидозов животных.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Определить белковый состав водно-солевых экстрактов, полученных из разных морфологических структур в онтогенезе гельминтов.
- Определить антителогенез у экспериментально инвазированных цистицерками животных.
- Определить антигены гельминтов и гуморальные белки хозяина, способные перекрестно реагировать с циркулирующими в крови антителами.
- Изучить особенности факторов естественной резистентности при экспериментальном цистицеркозе овец и свиней.
- Оценить количественные изменения Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в крови при экспериментальном и спонтанном цистицеркозе свиней и овец.
- Определить динамику Т-лимфоцитов, их популяций и В-лимфоцитов в органах иммуногенеза.
- Провести морфометрический анализ структурных компонентов брыжеечного лимфатического узла, селезенки, тимуса.
- Изучить количественные изменения клеток костного мозга при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец.
- Провести оценку сравнительной диагностической эффективности тестов при цистицеркозах свиней, овец на основе ИФР и дот-ИФР.
- Дать оценку диагностической эффективности ИФР и дот-ИФР для определения копроантигенов при кишечной инвазии тениями собак.

Научная новизна. Впервые методами электрофореза в SDS-PAGE (ДСН-ПААГ), иммуноблоттинга определены физико-химические свойства белковых компонентов антигенных экстрактов гельминтов, а также стадио- и видоспецифичные белки метацестод и теней. На основе экспериментальных данных и

комплексного исследования иммуно- и онтогенеза при цистицеркозах в системе паразит-хозяин проведен мониторинг антигенов гельминтов и выявлены закономерности их влияния на систему иммунитета при экспериментальных и спонтанных инвазиях. Эти данные подтверждены исследованиями, проведенными на молекулярном, клеточном и органном уровнях. Научная новизна исследований подтверждена патентом на изобретение №2219551 "Способ получения диагностического антигена цестод", 20.12.2003.

Впервые установлено влияние динамики антигенных молекул гельминтов, изменяющихся в процессе онтогенеза, на активность и пропорциональные отношения субпопуляций иммунокомпетентных клеток, морфометрические характеристики иммунокомпетентных органов.

Дополнены основные положения теории "адаптационной толерантности" при гельминтозах, а также предложена схема механизма биологического равновесия в системе паразит-хозяин.

Разработаны принципы иммунодиагностики метацестодозов и тениидозов животных. Впервые разработана диагностическая тест-система на основе дот-ИФР для диагностики антител в крови к возбудителю цистицеркоза свиней и овец (*S.taenuicollis*). Впервые разработана родоспецифическая тест-система на основе дот-ИФР для выявления копроантигена тений плотоядных.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основе разработанных теоретических положений развития иммунного ответа хозяина в онтогенезе паразита предложена схема двусторонней адаптивной толерантности, инициирующая формирование адаптивно-приобретенного равновесия в системе паразит-хозяин.

Проведен мониторинг антигенных свойств белков различных стадий развития гельминтов. На основе изучения антителогенеза при цистицеркозах охарактеризованы диагностические возможности групп белков гельминтов с различными физико-химическими свойствами, показана их диагностическая ценность в разных временных рамках развития тканевых личинок цестод.

Для изучения иммунологических процессов в ходе развития инвазии определено состояние факторов естественной резистентности и установлены структурно-функциональные характеристики центральных и периферических органов иммуногенеза, выявлены процентные соотношения Т- и В-лимфоцитов, их субпопуляций в крови. На основе полученных данных расширены представления о возможных направлениях патогенеза гельминтозов по пути развития аутоиммунных заболеваний животных.

Совместно с коллективом ученых-гельминтологов ВИГИС разработан метод культивирования на искусственных питательных средах клеток цестод для получения их диагностически ценных метаболитов.

На основе анализа диагностических свойств антигенов и сравнительных испытаний эффективности ИФР и дот-ИФР определены принципиальные подходы к выявлению цистицеркозов и тениидозов животных. Предложены схемы ИФР с целью выявления антител в крови к антигенам возбудителя цистицеркозов сельскохозяйственных животных. Разработана методика эффективного оп-

ределения копроантигенов на основе дот-ИФР, позволяющая выявлять инвазию за месяц до выделения зрелых проглоттид во внешнюю среду.

Результаты научных разработок, положения и выводы вошли в методические рекомендации “Обнаружение копроантигенов тениид собак на основе dot-ELISA”, одобренные Отделением ветеринарной медицины РАСХН 24.12 2002 г. в разработку патента на изобретение №2219551 “Способ получения диагностического антигена цестод” 20.12.2003.

Результаты исследований представлены в учебном пособии «Патогенез и иммунодиагностика гельминтозов». – М.: МГУПБ, 2004. – 52 с. Материалы диссертации используются в цикле лекций по курсу «Инвазионные и паразитарные болезни животных» в разделе «Общая паразитология».

Связь исследований с научной программой. Диссертация выполнена в соответствии с планом НИР МГУПБ и в рамках кафедральной программы (регистрационный номер 4-9-00-В). Часть исследований проводилась в рамках программы ВИГИС по Российской координационной НТП, заданию 3 - «Разработать новые теоретически обоснованные принципы профилактики паразитарных болезней животных и охраны окружающей среды от паразитов; осуществить поиск экологически безопасных средств, обеспечивающих оздоровление хозяйств с учетом современных достижений биологии, биотехнологии, иммунологии и генетики».

Апробация работы. Результаты научных и экспериментальных исследований доложены на международных научных форумах: 9 – 12-й Московские Международные ветеринарные конгрессы, Москва (2001 – 2004 гг.); 1 – 5-й Международной научно-практической конференции МГУПБ, Москва (1999 – 2004 гг.); Научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями», 2003 г., Москва; Объединенных сессиях Координационного совещания по ветеринарной паразитологии Центрального совета Общества гельминтологов РАН и секция «Инвазионные болезни животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН (26.05.00; 01.06.00; 20-22.02.01; 22-24.05.02; Москва), заседаниях Ученого совета ВИГИС (1998-2004).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Сравнительный анализ белковых и антигенных компонентов в онтогенезе цистицерков и тений (*S.bovis*, *S.taenuicollis*, *T.saginata*, *T.hydatigena*).
- Способы получения диагностического антигена.
- Динамика антителигенеза и состояние естественной резистентности животных при экспериментальной инвазии цистицерками.
- Иммуноморфологические изменения периферической крови и органов иммуногенеза в динамике инвазии метацестодами.
- Теоретические вопросы развития цистицерков за счет наличия общих белков и рецепторов клеточных структур в системе паразит-хозяин.
- Сравнительная диагностическая эффективность ИФР и дот-ИФР при метацестодозах и тениидозах животных.

Публикации результатов исследований. По материалам собственных исследований опубликованы 42 печатные работы, в которых отражено основное содержание диссертации.

Объем работы. Диссертация изложена на 350 страницах машинописного текста, состоит из введения трех глав собственных исследований, к каждой главе дается краткая литературная справка, обсуждение, заключение, практические результаты, теоретические положения. Содержит 32 таблицы, 51 рисунок. Список литературы включает 450 источников, из них 252 отечественных и 198 зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Работа выполнена в 1992–2004 гг. на кафедре инфекционных и паразитарных болезней ветеринарно-санитарного факультета Московского государственного университета прикладной биотехнологии.

Экспериментальная работа была выполнена на 83 сельскохозяйственных животных, искусственно и спонтанно зараженных цистицерками, на 163 собаках, спонтанно зараженных различными видами гельминтов, на 150 крысах, инвазированных цистицерками и 30 иммунизированных кроликах. Исследовались сыворотки крови от 3200 сельскохозяйственных животных, не инвазированных гельминтами, и от 70 – с гетерологичными инвазиями (по данным ветеринарно-санитарной экспертизы), от 1300 не инвазированных гельминтами собак (по данным копрологических исследований после проведенной профилактической дегельминтизации).

В работе были использованы физико-химические, иммунологические, иммунохимические, морфометрические и гельминтологические методы исследований, а также методы культивирования клеток гельминтов.

Физико-химические методы включали в себя комплекс хроматографических методов (гельфилтрация, ионообменная и аффинная хроматография, хроматография на FPLC), аналитический электрофорез в ПААГ-ДСН, электроперенос белков, определение концентрации белка по Лоури (1951) или Варбургу, Христиану (1941). Проведен анализ состава белков и антигенов водно-солевых экстрактов из различных стадий онтогенетического развития гельминтов и их морфологических структур *Cysticercus bovis*, *Cysticercus taenuicollis*, *Taeniarhynchus saginatus*, *Taenia hydatigena*.

Методы культивирования клеток гельминтов использованы для получения диагностически ценных метаболитов клеток цистицерков в искусственных питательных средах и включали в себя получение первичной и перевиваемой клеточной культуры метацистод. Проводили скрининг полученных метаболитов и реклонирование необходимых клеточных культур.

К иммунологическим методам отнесены способы получения поликлональных сывороток к водно-солевым экстрактам гельминтов с использованием 30 кроликов, 20 овец, 20 свиней, 3 телят и 150 крыс в качестве животных-продуцентов. Используются методы определения факторов естественного иммунитета (бактерицидной и лизоцимной активности крови, комплемента), а также исследования клеточных факторов иммунитета в крови и иммунокомпе-

тентных органах – определение В-лимфоцитов, определение Т-лимфоцитов и их субпопуляций. Идентификацию В-клеток (ЕАС-рок) проводили по N.S. Mendes et al. (1973); количество Т-лимфоцитов (Е-рок) определяли в реакции спонтанного розеткообразования по M. Jondal (1972); Т-хелперов и супрессоров – в теофиллиновом тесте по S.Limatibul et al. (1978).

Морфометрические исследования органов иммуногенеза применяли для изучения площадей, объема и количества структур на срезах иммунокомпетентных органов экспериментально зараженных цистицеркозом сельскохозяйственных животных (по 10 голов свиней и овец) с помощью окуляр-микрометров, сеток и приборов – E.Weibel (1970), Г.Г. Автандилов (1973). При этом использовали морфометрическую сетку А.А. Глаголева в модификации С.Б. Стефанова (1974). На окрашенных гематоксилин-эозином по Романовскому-Гимза гистологических срезах проводили расчеты относительного содержания структурных компонентов (соединительнотканного остова, капсулы или трабекул, коркового и мозгового вещества, фолликулов, синусов).

Иммунохимические методы использованы для определения активности антигенов и антителогенеза в сыворотках крови экспериментально и спонтанно инвазированных сельскохозяйственных животных. Было исследовано 3200 проб сывороток крови. Эти методы включали в себя иммуноблоттинг (ИБ), иммуноэлектрофорез (ИЭФ), различные варианты твердофазного ИФР на пластике и нитроцеллюлозной мембране (ELISA и dot-ELISA на выявление антигенов и антител к ним), реакцию двойной иммунодиффузии по Оухтерлони (РДП). Для выявления общих антигенных компонентов и перекрестных реакций, близких в филогенетическом отношении цистицерков, были использованы сыворотки крови от экспериментально инвазированных *S.taenuicollis* и *S. bovis* крупного рогатого скота. Сыворотки крови экспериментально инвазированного крупного рогатого скота были представлены сотрудниками ВИГИС и института паразитологии Чехии.

Для эффективного конструирования диагностических тест-систем исследовали сыворотки крови неинвазированных цистицерками сельскохозяйственных животных (1200 голов крупного рогатого скота, 1000 овец и 1000 голов свиней) и сыворотки крови от животных, инвазированных фасциолами, эхинококками и мониезиями. С целью поиска свободно циркулирующих антигенов гельминтов и антител к ним в дефинитивном хозяине исследовали 1300 проб сыворотки крови и 1300 проб фекалий плотоядных.

Гельминтологические методы исследования применяли для выявления желудочно-кишечных гельминтов у всех животных, которых исследовали иммунологическими и иммунохимическими тестами. При этом использовали методы Фюллеборна и нативного мазка. При экспериментальном заражении 20 ягнят и 20 поросят в 5-месячном возрасте использовали культуру яиц *T.hydatigena* в дозе 500 ± 120 яиц на голову. Жизнеспособность онкосфер определяли методом Г.А. Камаловой (1942), используя 0,2%-й раствор Na_2S .

Фрагменты работы по биохимическим, иммунологическим и гельминтологическим исследованиям проведены в ВИГИС, Башкирском государственном

аграрном университете, институте паразитологии Чехии, ветеринарных клиниках г. Москвы.

Статистическую обработку численных данных осуществляли с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты исследований получены лично автором. Участие соисполнителей отражено в списке опубликованных работ.

АНТИГЕНЫ ЦЕСТОД И ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ХОЗЯИНА

Водно-солевые экстракты получали из цистицерков различного возраста, передней и задней части стробилы тений, путем гомогенизации, используя фосфатно-солевой буфер (рН 7,2).

По принятой в паразитологии классификации полученные растворы белков мы относили к соматическим, т.е. потенциальным антигенам. Наибольший выход белка в экстракты (до 7 мг/мл) мы получали при гомогенизации тканей гельминтов в специальном устройстве Поттера-Эвельгейма. Лиофилизация экстрактов не изменяла их белкового спектра в электрофорезе ДСН-ПААГ, что позволило использовать их в течение двух лет.

Методом диск-электрофореза в SDS-PAGE (ДСН-ПААГ) в экстрактах *S.bovis* и *S.taenuicollis* нами установлены основные потенциальные соматические антигены, а также дифференцированы общие и видоспецифические белки. Характеристиками фракций служили относительная электрофоретическая подвижность и концентрация акриламида (Т%) на градиенте, до которой дошла фракция.

Всего было выделено 26 белковых фракций экстракта *S.taenuicollis*. Зарегистрировано 18 общих фракций для *S.bovis* и *S.taenuicollis*. Видоспецифическими для *S.taenuicollis* были признаны 8 из 26 фракций, а для *S.bovis* – 9 из 27 фракций. Тении имели меньше отличия по антигенному спектру, чем цистицерки, что обусловлено одинаковой средой их обитания. Экстракт *T.saginata* состоял из 23 белковых компонентов, 4 из них были признаны видоспецифическими, а *T.hydatigena* имел 24 компонента, из которых 4 являлись специфическими для этого вида.

Нами проведен анализ стадиоспецифических особенностей антигенного спектра *T.hydatigena* – половозрелая тения, *S.tenuicollis* 4- и 90-дневного возраста, а также *T.saginata* – половозрелая тения и *S.bovis* 60-, 90-, 180-дневного возраста.

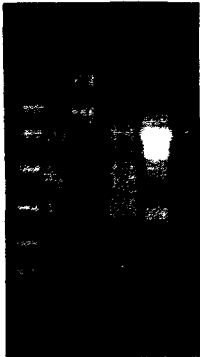
Из табл. 1 видны четкие отличия по количеству белков, их электрофоретической подвижности разных стадий развития гельминтов.

Меньшее количество белков с разной подвижностью в геле обнаружено у личинок *T.hydatigena* 4-дневного возраста. Общее количество белковых фракций у этой стадии гельминтов равнялось 21, специфическими для нее признаны 5 фракций, а остальные 16 групп белков были обнаружены и у других стадий развития. Наибольшее количество стадиоспецифических белков имели цистицерки *S.tenuicollis* и *S.bovis* 90-дневного возраста – 8 и 9 соответственно. Тении из кишечника дефинитивных хозяев имели по четыре стадийных белка.

При разделении белков из разных морфологических частей гениев нами отмечено, что экстракты сколекса и передних сегментов имели белковые спектры с выраженным максимальным количеством белка более низкой молекулярной массы (рис.1). Так, большинство мажорных белков спектра Т.сЭКС2 были расположены между маркерами от 67 до 14 кДа, в то время как экстракты концевых проглотид (Т.сЭКС1 и Т.нЭКС1) в своем электрофоретическом треке имели мажорные белки более высокой молекулярной массы – от >94 до 30 кДа

Таблица 1
Стадиносpezifические особенности антигенных спектров цестод
в электрофорезе ДСН-ПААГ

Кол-во полос	T hydatig	S taen4	S taen 90	T sagin	S bov 60	S bov 90	S bov 180
Общие	24	21	26	23	23	27	24
Специфичные	4	5	8	4	5	9	7
Разница	20	16	18	19	18	18	17



а б в г д е

Рис. 1. Белки водно-солевых экстрактов цестод из разных морфологических структур гениев и стадий их развития (электрофорез ДСН-ПААГ)

Слева направо 1-й трек маркеры – сверху вниз phosphonlase 94 кДа, ovalbumin 67 кДа, carbonic anhydrase 30 кДа, trypsin inhibitor 20 кДа, alpha lactalbumin 14400 кДа, далее белки экстрактов а) из сколекса шейки и первых 5-7 члеников T saginata (Т.сЭКС2) б) экстракт из зрелых концевых проглотид T saginata (Т.сЭКС1) в) из 4-дневных личинок T hydatigena (Т.нЭКС4) г) экстракт из зрелых концевых проглотид T hydatigena (Т.нЭКС1), е) внутрипузырная жидкость S taenuicollis (30-й день инвазии)

Основные группы белков экстракта 4-дневных личинок (Т.н.ЭКС4) располагались между маркерами 67 и <14 кДа. Внутрипузырная жидкость цистицерка (S.taenuicollis) содержала незначительное количество белка. Основные три группы белковых компонентов имели молекулярную массу 80, 70, 50 кДа

Таким образом методом электрофореза ДСН-ПААГ определены физико-химические характеристики основных групп белков экстрактов гельминтов из различных морфологических структур цистицерков разного возраста, гениев и определены общие, стадино- и видоспецифические белки S bovis, T.saginitus, S.taenuicollis, T.hydatigena

Хроматографические методы использовали для более полного представления о физико-химических свойствах белков гельминтов. При разделении водно-солевых экстрактов гельминтов хроматографическим способом – гель-фильтрацией на Toyopearl HW-55 (Fine) с использованием УФ-детектора (280 нм) во всех случаях мы получали четыре пика. Экстракты стробил гениев (Т.нЭКС1 и Т.нЭКС2) разделялись на четыре белковых пика менее рельефно, чем экстракты личинок (Т.нЭКС4). Иммунологическую активность белков оп-

ределяли иммуноферментным тестом (ИФР, ELISA). Наиболее активными в ИФР были компоненты с молекулярной массой около 70 – 85 кДа.

Во всех разделенных экстрактах имелись компоненты, обладающие общими физико-химическими свойствами, однако эффективность их использования в ИФР в качестве диагностических антигенов была разной. При диагностике экспериментального бовисного цистицеркоза оптимальным было применение в качестве диагностического антигена белка с молекулярной массой 85 кДа, полученного из T.s.ЭКС1. При диагностике спонтанного бовисного цистицеркоза наиболее эффективной является фракция с меньшей молекулярной массой 20 – 40 кДа. Высокомолекулярные фракции (>100 кДа) давали ложноположительные реакции. Для эффективной диагностики цистицеркоза овец (*S.taenuicollis*) применяли гомологичные антигены – при спонтанной инвазии – 20 кДа и ниже, а при экспериментальной инвазии 60 – 90 кДа молекулярной массы, выделенные из экстрактов цистицерков или теней.

При хроматографии на FPLC экстракта T.h.ЭКС1 получено 15 пиков, из них 9 относятся к мажорным, а 6 – к минорным компонентам. При этом многие белки водно-солевых экстрактов цистицерков и теней имели общие физико-химические свойства. Поэтому белки, выходящие по фракциям, были максимально приближены друг к другу по времени выхода с колонки. Количество белка, обнаруженное в каждой фракции, не позволило оценить их диагностическую ценность в ИФР.

С помощью ионообменной хроматографии, проведенной на колонке моно S HR 5/5, из водно-солевых экстрактов гельминтов было выделено три фракции, разделенные по принципу электростатического взаимодействия белковых молекул с сорбентом. Следует отметить, что только две из трех фракций обладали антигенной активностью. Внутри рода между видами исследуемых теней и цистицерков было выявлено сродство антигенных компонентов и возможность их использования в диагностике гомологичных и гетерологичных изучаемых нами метацестодозных инвазий сельскохозяйственных животных. Наибольшей активностью в ИФР обладала фракция белков, полученная при элюции между 0,2 и 0,4 М NaCl. Фракции второго пика обладали большей преципитирующей активностью в иммунодиффузии. Третья фракция показала отсутствие специфичности в ИФР и не выявляла ни одной положительной сывортки от экспериментально зараженных животных.

Таким образом, нами проанализирована эффективность хроматографических методов разделения белковых экстрактов гельминтов (гель-фильтрация и ионообменная хроматография в обычных условиях и хроматография на FPLC-системе). Показана возможность предварительной очистки водно-солевых экстрактов с помощью хроматографических методов.

Клеточные культуры гельминтов мы получали из тканей цестод на разных стадиях развития. При этом оценивали антигенные свойства и диагностическую ценность метаболитов клеток. Нами изучались метаболиты клеточных культур клеток концевых проглоттид *T.hydatigena* – Met.1, клеток стенки пузыря *T.hydatigena* – Met.2, клеток разрушенных протосколексов *E.granulosus* – Met.3 и клеток личинок 4-дневного возраста *T.hydatigena* – Met.4. Для культури-

вирования клеток гельминтов использовали среды: ИГЛА, 199, ДМЕМ. Для определения диагностической ценности метаболитов использовали ИФР

Наиболее быстрый и стабильный рост всех клеток отмечен на среде ДМЕМ. Клетки тканей половозрелых гельминтов через 14 – 16 дней образовывали монослой на всей поверхности дна лунки планшета (рис. 2). Если в процессе предварительной обработки и разрушения тканей концевых фрагментов стробилы сохранялись яйца, то через 5 – 8 суток культивирования они начинали разрушаться, вокруг образовавшихся обломков яичной скорлупы гельминтов появлялись единичные клетки, а затем и их колонии.

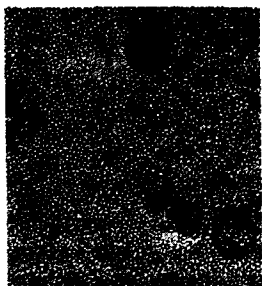


Рис. 2. Фото фрагмента монослоя 8-дневной клеточной культуры генией (x 400)

Клетки из разрушенных прогосколексов и личинок 4-дневного возраста обладали наиболее быстрым ростом. В течение 7 – 10 суток формировался монослой на дне планшета. Еще через 3 суток возникла необходимость посева живых клеток в другие планшеты, так как деление их замедлялось, 10 – 15 % клеток погибало и на пластике не оставалось места для вновь образующихся клеток.

Метаболиты, обладающие антигенными и диагностическими свойствами, были обнаружены во всех культуральных жидкостях. Однако наиболее быстрое накопление диагностически ценных метаболитов установлено в культуре личинок 4-дневного возраста. Через 10 суток после посева клеток установилась достаточная концентрация метаболитов этой культуры, и их можно было использовать для выявления цистицеркозов животных. Метаболиты других культур (Met.1 и Met.2) накапливались в необходимых количествах к 15 – 17 суткам культивирования и были менее специфичны.

Таким образом, лучшей питательной средой оказалась ДМЕМ, наиболее продуктивной культурой клеток была признана культура, полученная из быстрорастущих личинок 4-дневного возраста. Лучшие диагностические свойства выявлены у метаболитов – Met.4, полученных на 10-й день культивирования клеток 4-дневного возраста личинок.

Методом иммуоблоттинга с помощью поликлональных сывороток, полученных от зараженных цистицерками животных в разные сроки инвазии, изучали антигенный спектр белков водно-солевого экстракта концевых проглотид – Т hЭКС1 (рис. 3). У всех трех видов животных до экспериментального заражения в крови имелись нормальные антитела, которые связывали четыре антигенных компонента экстракта. У зараженных свиней на 20-й день инвазии

регистрировали антитела на шесть антигенных компонентов. В этот день инвазии появлялись новые антитела к антигенам молекулярной массы ~ 25 и 55 кДа. В дальнейшем на 40-й день инвазии выявляли дополнительно антитела к белкам молекулярной массы (м.м.) ~12, 20 кДа, 67 и 60 кДа. В последующие дни эксперимента полосы комплексов антиген-антитело на нитроцеллюлозной мембране становились более насыщенными и, поскольку водно-солевой экстракт всегда был использован в одной концентрации по белку, то можно говорить об увеличении количества антител. Также появлялись и новые антитела к белкам м.м. ~ 30, 32, 35 и 40 кДа. На 90-й день инвазии регистрировали антитела в сыворотках крови цистицеркозных свиней к четырнадцати антигенным компонентам водно-солевого белкового экстракта теней.

У овец динамика антител несколько отличалась, и антитела к белкам м.м.~ 30, 32 и 34 кДа появлялись раньше – на 40-й день инвазии. Антигенные компоненты м.м. 20 кДа начинали выявляться сывороткой крови зараженных овец на 20-й день инвазии, а 12 кДа – на 40-й день и до конца эксперимента. На 60-й день заражения регистрировали новые антитела к антигенным группам 80 и 87 кДа. На 90-й день инвазии были обнаружены антитела к 15-ти потенциальным антигенам гельминтов.

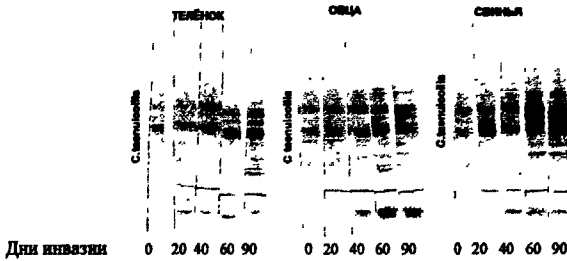


Рис. 3 Динамика антителогенеза в иммуноблоттинге у разных видов животных при экспериментальном заражении *C.taenuicollis*

У телят, экспериментально зараженных *C.taenuicollis*, в большинстве случаев выявляли антитела к тем же группам антигенов, что и у овец. Однако отмечали их другую количественную характеристику. Например: антитела к антигенам м.м. 80 и 87, 60 и 67 и 34 кДа образовывали более четкие и толстые линии с антигенами, а антитела к антигенам м.м. 32 и 30 кДа выявляли только на 90-й день инвазии. Антитела к белкам м.м. ~ 60 и 67 кДа появлялись в процессе инвазии раньше, чем у овец, т.е. на 20-й день инвазии. На 90-й день экспериментального заражения в сыворотках крови крупного рогатого скота регистрировали антитела к 15-ти потенциальным антигенам гельминтов.

По результатам иммуноблоттинга при спонтанной инвазии тканевыми гельминтозами установили основные антигенные компоненты TsЭКС1, на которые образуются антитела в крови зараженных животных. При выявлении спонтанной инвазии крупного рогатого скота *Cysticercus bovis*, *Echinococcus granulosus*, *Fasciola hepatica* нами установлено, что основные белки, которые

связывались антителами зараженных животных, имели следующие молекулярные массы: >90 кДа, 68 кДа, 27 кДа. Только 20 % гомологичных сывороток имели более полный набор антител, который характеризовался образованием 8 – 10 линий преципитации на нитроцеллюлозной мембране.

Таким образом, в иммуноблоттинге нами определены основные группы белков антигенных экстрактов, на которые вырабатываются антитела при экспериментальной и спонтанной инвазии цистицеркозами животных. Установлено, что при спонтанной инвазии бовисным цистицеркозом только у 20 % животных вырабатываются антитела к специфическим антигенным компонентам. Возможно, это связано с недостаточной чувствительностью данного варианта иммуноблоттинга как диагностического метода.

Причины возникновения ложноположительных реакций изучали в иммуноблоттинге. Как видно на рис. 4 спектр комплексов антиген–антитело на 1 и 2 треках одинаков.



Рис.4. Белки хозяина перекрестно-реагирующие с антителами в иммуноблоттинге:

1 – перитонсальная жидкость (а/г) + сыворотка незараженного животного (а/г); 2 – перитонеальная жидкость (а/г) + сыворотка зараженного животного (а/г); 3 – сыворотка крови незараженного животного (а/г) + сыворотка незараженного животного (а/г); 4 – сыворотка крови незараженного животного (а/г) + сыворотка зараженного животного (а/г)

В перитонеальной жидкости овец существуют белки, которые способны взаимодействовать с нормальными антителами крови и с антителами крови к антигенам цистицерков.

Четыре белка имели одинаковые физико-химические свойства в электрофорезе и иммунологические характеристики на мембране в иммуноблоттинге, определены их молекулярные массы 30, 67; 70 и 90 кДа. На треках 3 и 4 выявлены комплексы антиген – антитело при взаимодействии белков крови и антител. При этом установлено, что в крови зараженных цистицерками овец (*S.taenuicollis*) имелись антитела, которые связывали 8 белков крови различной молекулярной массы: > 90 кДа (3 белка), 90; 70; 67; 30 и 25 кДа. В крови незараженных цистицерками животных нормальные антитела могли взаимодействовать с пятью белками крови. Таким образом, диапазон постинвазионного антителогенеза овец был шире и дополнялся антителами к белкам крови, имеющих высокую молекулярную массу ≥ 94 кДа. По нашему мнению, это свидетельствует о том, что инвазия цистицерками вызывает продукцию антител, которые способны связывать белки гельминта и некоторые собственные высокомолекулярные белки. Такими белками могут быть белки острой фазы (С-реактивный белок 110 кДа, гаптоглобин 100 кДа и др.), альбумины 67 кДа и глобулины, в том числе IgG 150 кДа.

Таким образом, в иммуноблоттинге нами показана специфичность антител трех видов сельскохозяйственных животных, зараженных цистицерками (*C. taenuicollis*) к группам белков экстрактов гельминтов (потенциальным, соматическим антигенам). Доказано наличие общих антигенных структур паразитов с белками сыворотки крови и перитонеальной жидкости хозяина. С одной стороны, это обеспечивает появление ложноположительных ответов в иммунодиагностических тестах, с другой стороны, является одним из направлений адаптации паразита к хозяину и обуславливает условия для формирования особенностей иммуногенеза при гельминтозах. Наличие у гельминтов и их хозяев общих антигенных детерминант, влияющих на характер взаимоотношений в системе паразит-хозяин, неоднократно подтверждено многими исследованиями. В частности, в тканях эхинококковых пузырей выделены белки, обладающие общими антигенными свойствами с С-реактивным белком, IgG, антигенами эритроцитов, перекрестно-реагирующие с антигенами печени (Р.С. Шульц, F.V. Гвоздев, 1976).

По нашему мнению, в ходе развития инвазии гельминтам удается мигрировать и выживать за счет наличия общих антигенных структур с белками острой фазы и глобулинов хозяина, что снижает эффективность воспалительных реакций, замедляет формирование специфических антител к гельминтам, а также уменьшает эффективность действия низкоаффинных антител. После формирования паразитарной капсулы контроль над деятельностью паразита со стороны хозяина осуществляется с помощью идиотип-антиидиотипического равновесия и иммунных клеток памяти. Таким образом, для своей жизнедеятельности паразит использует защитные системы самого хозяина. С другой стороны, наличие данных иммунных реакций даст возможность организму хозяина осуществлять селективный контроль над персистирующими антигенами цистицерков.

Вполне возможно, в системе паразит-хозяин существуют и другие факторы, снижающие эффективность защитных систем хозяина. Известно, что некоторые антигены гельминтов имеют углеводную природу для них характерны повторяющиеся однотипные детерминанты (В.С. Ершов, 1983). Антигены этой природы способны вызывать поликлональный иммунный ответ. Их митогенная активность, выражающаяся в неспецифической активации В-лимфоцитов, приводит к ингибированию специфического иммунного ответа (Э.Х. Даугалиева, 2002).

ЕСТЕСТВЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ОСОБЕННОСТИ ИММУНОГЕНЕЗА ПРИ ЦИСТИЦЕРКОЗАХ ЖИВОТНЫХ

Изучение естественной резистентности и особенностей иммуногенеза проводили на экспериментально и спонтанно зараженных цистицеркозом (*C. taenuicollis*) свиньях и овцах (n=80). В опытах использовали животных 5-месячного возраста, контрольную группу (n=20) содержали в аналогичных условиях, и исследуемые пробы от нее получали в те же сроки, что и от экспериментально зараженных животных. Иммуногенез при спонтанной инвазии овец и

свиней *S.taenuicollis* изучали на убойных животных текущего года рождения с учетом данных ветеринарно-санитарной экспертизы мясокомбинатов (n=20). Пробы получали от животных, зараженных только тениюкольными цистицерками, при отсутствии других тканевых и желудочно-кишечных гельминтов (по данным ветеринарно-санитарной экспертизы мясокомбинатов).

Анализ факторов естественной резистентности и иммуногенеза при экспериментальной инвазии

Бактерицидная активность сывороток крови овец, экспериментально зараженных цистицеркозом, снижалась по сравнению с контрольными к 5 суткам на 14,22 %, к 10 – на 4,73%, к 15 – на 10,32%. Через 30 суток инвазии бактерицидная активность крови была равна контрольным показателям – $45,42 \pm 3,21$ %, которая сохранялась в последующем, на 60 и 90-е сутки. В частности, у зараженных животных она составила $43,40 \pm 4,28$ и $44,10 \pm 3,76$ %, соответственно.

Установлено, что динамика бактерицидной активности сыворотки крови овец и свиней при цистицеркозе имела одинаковые закономерности – в первые пять суток экспериментальной инвазии активность понижалась, на 10-е сутки – повышалась, к 15 суткам наблюдалось вторичное понижение, а с тридцатого дня инвазии отмечены равные значения бактерицидной активности в опытных и контрольной группах животных.

Лизоцимная активность в сыворотке крови зараженных свиней и овец повышалась. У свиней она повысилась к 5 суткам заражения на 4,9 %, к 10 суткам – на 14,1 %. На 30-е сутки экспериментальной инвазии активность лизоцима приближалась к контрольным значениям и равнялась $22,10 \pm 2,78$ %. На 60 и 90-е сутки зарегистрированы статистически недостоверные различия в опытной и контрольной группах ($P > 0,05$).

Лизоцимная активность сыворотки крови зараженных овец имела график таких же пиков и падений. Однако они были менее рельефны, с меньшей амплитудой колебаний. На 60 и 90-е сутки отмечены недостоверные различия между опытной и контрольной группами ($P > 0,05$).

Таким образом, активность лизоцима в сыворотке крови зараженных свиней и овец была диаметрально противоположна бактерицидной активности – на 5 и 10-е сутки инвазии повышалась, а начиная с 30-го дня инвазии, его активность была ниже контрольных значений и статистически недостоверна.

Комплементарная активность сыворотки крови свиней контрольной группы находилась на уровне от $27,90 \pm 1,04$ %. Цистицеркозная инвазия оказывала влияние на комплементарную активность сыворотки крови в первые дни инвазии. На пятые сутки заражения этот показатель уступал контрольной цифре на 14,1 %. Тенденция понижения активности комплемента прогрессировала до 10-го дня. Затем отмечали резкое повышение активности комплемента, и на 60-е сутки данный показатель был выше, чем в контроле на 7,1 %, к 90 суткам – на $8,41$ % ($36,42 \pm 0,86$ %).

У зараженных овец активность комплемента снижалась на 5, 10 и 15-е сутки инвазии, и имела значения $14,30 \pm 1,02$; $9,48 \pm 0,76$ и $11,20 \pm 0,56$ %, соответственно. К 30 суткам отмечали повышение показателя, на 60 и 90-е сутки их уровень приблизился к контрольным и фоновым значениям.

Анализ полученных результатов исследований показал, что в начале инвазии при экспериментальном цистицеркозе овец и свиней, изменялись основные параметры баланса защитного статуса организма. Максимальные отклонения у больных животных от значений параметров естественной резистентности групп контрольных животных были получены до 30-го дня экспериментального заражения. Лизоцимную и бактерицидную активность сыворотки крови, ее систему комплемента относят к числу наиболее эффективных неспецифических факторов резистентности. Однако при тестировании защитных свойств организма основным методическим принципом является изучение функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, позволяющей оценивать конкретные нарушения в иммунной системе.

Динамика Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров при экспериментальном цистицеркозе свиней представлена в табл. 2 и 3.

Таблица 2

Динамика Т-лимфоцитов, их субпопуляций в крови при экспериментальном цистицеркозе свиней (М±m)

Лимфоциты, %	Контроль	Дни после заражения, (n=20)				
		5	15	30	60	90
Е-РОК	$42,91 \pm 4,08$	$58,60 \pm 3,19^*$	$44,70 \pm 4,87$	$63,70 \pm 3,60^*$	$46,00 \pm 4,80$	$49,42 \pm 2,49$
Т-хелперы	$25,70 \pm 0,35$	$15,85 \pm 1,21^*$	$38,20 \pm 0,48^*$	$27,11 \pm 1,93$	$31,65 \pm 1,39^*$	$26,19 \pm 1,52$
Т-супрессор	$18,40 \pm 1,15$	$43,50 \pm 1,41^*$	$7,02 \pm 1,15^*$	$36,40 \pm 3,41^*$	$12,40 \pm 1,74^*$	$21,34 \pm 1,72$

*) показатели достоверны по отношению к контрольной группе ($P < 0,05$)

В крови уровень Е-РОК-лимфоцитов на 5-е сутки инвазии повышался до $58,60 \pm 3,19$ %, на 15-е сутки отмечали снижение до $44,70 \pm 4,87$ % на 30-е сутки вторичное и самое высокое повышение до $63,70 \pm 3,60$ %, а затем уровни общего количества Т-лимфоцитов снижались и были приближены к контрольным показателям.

Значения Т-хелперов на 5-е сутки инвазии снижались до $15,10 \pm 1,21$ %, а к 15 суткам, отмечали их увеличение до $38,20 \pm 0,48$ %, которое было наиболее высоким в процессе экспериментальной инвазии. На 60 и 90-е сутки их значения равнялись $31,70 \pm 1,39$ и $26,10 \pm 1,52$ %, соответственно.

Максимальное количество супрессоров отмечали на 5-е сутки инвазии ($43,50 \pm 1,41$ %), затем их резкое снижение в крови, т.е. на 15 сутки – $7,02 \pm 1,15$ %. Динамика Т-супрессоров в крови цистицеркозных свиней до 15-ти суток инвазии была прямо противоположна таковой Т-хелперов.

В крови овец общее количество Т-клеток до заражения *T.hydatigena* у контрольной группы животных в среднем равнялось $58,60 \pm 1,04$ %. На 5-й день эксперимента отмечали повышение общего количества этих клеток за счет увеличения Т-супрессоров, в то время как уровень Т-хелперов снижался. Количе-

ство Е-РОК в крови овец было следующим: 74,20±2,34 % на 5-е сутки; 42,60 ±1,65 % на 15-е сутки; 66,30±2,47 % на 30-е сутки; 59,00±1,76 % на 60-е и 60,20 ±1,45 % на 90-е сутки цистицеркозной инвазии.

Динамика Т-хелперов и Т-супрессоров в крови при экспериментальном цистицеркозе овец была аналогична таковой у свиней. На 60 и 90-е сутки в крови зараженных овец циркулировало на 3 – 4 % супрессоров выше, чем в контрольной группе животных.

Таким образом, нами была установлена динамика Т-клеток и их субпопуляций в крови свиней и овец при экспериментальном цистицеркозе. Их количества и соотношения зависели от срока развития инвазии.

В брыжеечном лимфатическом узле при экспериментальном цистицеркозе свиней отмечалось снижение числа Е-РОК-лимфоцитов: к 30 суткам ~ в 2 раза, а к 90 суткам оно возросло и достигало уровня 28,90±2,49 %, что лишь на 3 % меньше, чем контрольные значения (табл. 3). Активность Т-хелперов брыжеечного лимфатического узла на 30-е сутки была ниже контроля на 4,90 %. К 90 суткам инвазии свиней *S. taeniacollis* активность хелперов превышала контроль на 1,60 %, что было статистически недостоверным.

Супрессорные клетки также имели подобную динамическую кривую, но их количество на 30-е сутки заражения по сравнению с контролем было меньше только на 3,5 %. К 90 суткам количество супрессоров превышало контрольные значения на 4 %.

Таблица 3

Динамика Т-лимфоцитов, их субпопуляций в органах иммуногенеза при экспериментальном цистицеркозе свиней (*Mim*)

Лимфоциты, %	Контроль, (n=10)	Дни после заражения	
		30	90
БРЫЖЕЕЧНЫЙ ЛИМФАТИЧЕСКИЙ УЗЕЛ			
Е-РОК	32,10±1,77	15,40±2,67*	28,90±2,49
Т-хелперы	19,10±1,19	12,20±1,07*	22,70±1,36*
Т-супрессоры	12,10±1,76	11,60±1,60	13,90±1,26
СЕЛЕЗЕНКА			
Е-РОК	30,33±0,33	16,70±0,90*	33,43±0,87
Абсолют. количество, млн.		Тимус	
Е-РОК	432,50±18,67	250,54±5,58*	492,3±9,73*

*) показатели достоверны по отношению к контрольной группе ($P \leq 0,05$)

В организме зараженных овец отмечено снижение общего количества Т-клеток к 30 суткам инвазии и их увеличение до 26,20±2,72 % на 90-е сутки эксперимента. Количество хелперов к 30 суткам заражения уменьшалось до 8,90±1,76 %, что практически на 10% ниже контрольных значений. Однако к 90 суткам инвазии разница между их количеством в контроле и эксперименте составила только 1,2 %. Т-супрессоры снижали свою активность на 2,2 % к 30 дню. В последующем их количество было выше контрольного на 2,8 %.

Таким образом, клеточный состав брыжеечных лимфатических узлов претерпевал изменения в процессе развития цистицеркозной инвазии овец и свиней. Причем в начале экспериментального заражения отмечалось численное понижение всех активно участвующих в иммунитете клеток, но супрессорная активность изменялась меньше, что дает возможность говорить об их пропорциональном увеличении в популяции и смещении акцента действия системы в сторону супрессии.

В селезенке свиней, экспериментально зараженных цистицерками, регистрировали значительное понижение уровня Е-РОК-лимфоцитов (табл. 3). На 30-е сутки заражения содержание Е-РОК-лимфоцитов в селезенке свиней опытной группы было ниже контрольного уровня в 1,72 раза. К 90 суткам инвазии нами отмечено повышение уровня общего количества Т-лимфоцитов до $33,43 \pm 0,87$ %, что превосходило контрольные показатели на 3 %.

К 30 суткам заражения уровень Т-лимфоцитов в селезенке овец понизился в 2,02 раза. К 90 суткам инвазии уровень Т-лимфоцитов в селезенке приближался к численным значениям контрольной группы. Количество Е-РОК-лимфоцитов превосходило контроль на 3 %.

В тимусе здоровых свиней Е-РОК-лимфоциты в абсолютном исчислении выделялись в количестве $431,40 \pm 18,67$ млн./орган.

В тимусе цистицеркозных свиней наблюдалось нарушение процессов созревания клеток, что приводило к снижению количества Е-РОК-лимфоцитов к 30 дню эксперимента в 1,42 раза (на 250,0 млн./орган), а к 90 дню их количество выросло до $492,30 \pm 9,73$ млн./орган, что на 60 млн. превышало контрольные значения.

В тимусе овец контрольной группы уровень Т-лимфоцитов колебался в пределах $408,90 \pm 6,76$ млн./орган. У животных, зараженных цистицерками, в начале инвазии регистрировали значительное понижение содержания Е-РОК в тимусе. На 30-й день эксперимента уровень Т-лимфоцитов в тимусе овец был ниже, чем у контрольных животных в 1,48 раза (на 134,3 млн./орган). К концу опыта (90 дней) эта разница имела уже положительные значения и была выше контрольных цифр на 20 млн./орган.

Динамика ауто-РОК лимфоцитов крови при экспериментальной инвазии овец (*S. taeniacollis*) была положительная, их количество увеличивалось, и на 30-е сутки равнялось $7,2 \pm 0,3$ % (рис. 5). В дальнейшем кривая динамики не поднималась выше и была на уровне $6,0 \pm 0,2$ и $5,8 \pm 0,2$ % на 60 и 90-е сутки соответственно.

Таким образом, в процессе инвазии мы наблюдали повышение количества клеток, несущих на своей поверхности рецепторы к антигенным структурам собственных эритроцитов. По мнению Сагаих et al. (1979), ауторозеткообразующие клетки относятся к супрессорной популяции и участвуют в регуляции иммунологических процессов, в частности в дифференцировке В-лимфоцитов. С другой стороны, по мнению К.Г. Курочкиной с соавт. (1997), увеличение абсолютного и относительного числа ауто-РОК в крови животных может говорить о повышении функциональной активности Т-лимфоцитов.

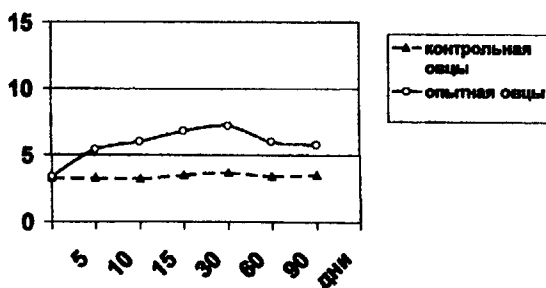


Рис. 5. Динамика ауто-РОК лимфоцитов крови при экспериментальном цистицеркозе овец

Доказано увеличение количества лимфоцитов, несущих рецепторы к собственным антигенам при цистицеркозной инвазии. Динамика ауто-РОК лимфоцитов при экспериментальной инвазии овец (*S.taenuicollis*) была положительная, их количество все время увеличивалось до 30-го дня эксперимента. В дальнейшем кривая динамики не поднималась и была на 2,3 % выше контрольных значений.

В-лимфоциты в крови здоровых свиней контрольной группы находились на уровне $17,4 \pm 0,78$ % (табл. 4).

У животных, зараженных цистицерками, регистрировали выраженное снижение активности ЕАС-клеток. На пятые сутки эксперимента их уровень понизился, по сравнению с показателем контроля на 8,1 %, на 15-е сутки – их уровень повысился на 14,8 %, а к 30 суткам снова снизился до 10,22 %. Однако на 60 и 90-е сутки уровни В-клеток превосходили контрольные значения и были равны 25,7 и 22,6 %, соответственно.

Таблица 4

Динамика ЕАС лимфоцитов в крови при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец ($M \pm m$)

Группы (n=20)	Контроль, %	Сроки исследования в днях после заражения				
		5	15	30	60	90
Свиньи	$17,40 \pm 0,78$	$9,30 \pm 1,06^*$	$32,42 \pm 0,8^*$	$10,22 \pm 0,76^*$	$10,22 \pm 0,82^*$	$25,70 \pm 1,56^*$
Овцы	$18,50 \pm 0,81$	$10,10 \pm 1,86$	$28,40 \pm 1,76$	$16,90 \pm 1,09$	$24,10 \pm 0,84$	$22,70 \pm 1,76$

*) показатели достоверны по отношению к контрольной группе ($P < 0,05$)

Подобным образом изменялась динамика ЕАС-РОК в крови овец, зараженных цистицерками. Если у животных контрольной группы их уровень находился в пределах от $18,50 \pm 0,81$ %, то при цистицеркозе содержание ЕАС-клеток понизилось к 5 суткам эксперимента, по сравнению с контролем на 9,2 %. На 15-е сутки гельминтозной инвазии нами зарегистрировано повышение до

28,4 %, а в последующие дни снижение процентного содержания В-клеток до 24 – 22 %, эти цифры превосходили контрольные значения ~ на 5 %.

Динамика ЕАС-лимфоцитов в брыжеечном лимфатическом узле при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец приведена в табл. 5.

В лимфоузле здоровых свиней контрольной группы ЕАС-лимфоциты выявлялись в количестве $20,20 \pm 1,10$ %. У экспериментально зараженных животных наблюдали прогрессивное понижение активности В-клеток. На 30-е сутки инвазии их уровень уступал контрольной цифре в 2,3 раза, к 90 дню их значения выросли до $18,30 \pm 2,28$ %.

Таблица 5
Динамика ЕАС-лимфоцитов (%) в органах иммуногенеза при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец ($M \pm m$)

Группы	Контроль	Сроки инвазии	
		30 дней	90 дней
БРЫЖЕЕЧНЫЙ ЛИМФАТИЧЕСКИЙ УЗЕЛ			
Свиньи (n=10)	$20,20 \pm 1,10$	$8,70 \pm 1,04^*$	$18,30 \pm 2,28$
Овцы (n=10)	$18,50 \pm 0,85$	$10,40 \pm 0,70^*$	$16,50 \pm 1,08$
СЕЛЕЗЕНКА			
Свиньи (n=10)	$38,90 \pm 3,02$	$17,80 \pm 1,80^*$	$37,80 \pm 1,80$
Овцы (n=10)	$37,60 \pm 1,70$	$17,30 \pm 1,06^*$	$32,10 \pm 1,76$

*) показатели достоверны по отношению к контрольной группе ($P \leq 0,05$)

В брыжеечном лимфоузле овец контрольной группы содержание В-клеток за период наших опытов находилось на уровне $18,30 \pm 0,87$ %. В лимфоузле зараженных овец уровень ЕАС-лимфоцитов уступал контролю к 30 дню в 1,54 раза. К концу опытов количество В-лимфоцитов выросло, разница между контролем и опытом была недостоверна.

Количество В-лимфоцитов в селезенке зараженных свиней к 30 суткам эксперимента было ниже контроля в процентном отношении в 2,21 раза (на 21,1 %). К 60 дню экспериментального заражения количество В-лимфоцитов селезенки приближалось к контрольным значениям, и было равно $37,80 \pm 1,80$ %.

Количество ЕАС-лимфоцитов в селезенке зараженных овец к 30 дню понизилось – в 2,17 раза. К 90 суткам экспериментального заражения численные значения В-лимфоцитов были равны $32,10 \pm 1,76$ %, что приближалось к контрольным показателям. Таким образом, динамика клеточного состава селезенки соответствовала активности личинок во время миграции и их роста.

Исследование динамики Т- и В-лимфоцитов при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец свидетельствует об изменениях, на уровне клеточного и гуморального звена иммунитета в начале инвазии. Впервые пять суток заражения происходило увеличение в крови общего количества Т-клеток, в то время как количество Т-хелперов резко снижалось, Т-супрессоров увеличивалось. В крови регистрировали повышенное количество ауто-РОК лимфоцитов. Аналогичные изменения Т-клеток происходили и в периферических органах иммуногенеза: селезенке, брыжеечном лимфатическом узле. Количество В-

лимфоцитов на 5-е сутки уменьшалось во всех исследуемых тканях – крови, лимфоузлах, селезенке. К 60 суткам инвазии количество В-лимфоцитов превышало контрольные данные только в крови, а в периферических органах иммуногенеза оставалось ниже таковых на 2 – 3 %. В центральном органе иммуногенеза – тимусе количество Т-лимфоцитов на 30-е сутки резко уменьшалось до $250,54 \pm 5,58$ млн., затем на 90-е сутки поднималось до $493,30 \pm 10,11$ млн.

Отмеченные изменения клеточного состава крови и органов иммуногенеза привели к недостаточной эффективности действия тканевого и гуморального иммунитета, что позволило личинкам совершить миграцию и развиваться в инвазионные цистицерки.

Количественные характеристики Т- и В-лимфоцитов крови при спонтанной инвазии

Т- и В-систему иммунитета изучали на спонтанно инвазированных цистицерками 20 овцах и 20 свиньях текущего года рождения, при этом выявляли от 1 до 7 личинок, локализованных на сальнике и брыжейке.

Результаты исследований *Т-системы иммунитета* при спонтанной инвазии свиней представлены в табл. 6. При регистрации цистицеркозной инвазии в июне уровень Е-РОК-лимфоцитов был ниже уровня неинвазированных животных (контроль) в 1,3 раза (на 11,3 %), Т-хелперов – в 1,4 раза (на 6,3 %).

Таблица 6

Количественная характеристика Т- и В-лимфоцитов в периферической крови при спонтанном цистицеркозе овец и свиней

Животные	Лимфоциты	Контроль	Инвазия		
			Июнь	Сентябрь	
Т-ЛИМФОЦИТЫ					
Свиньи	Е-РОК	М	52,60	41,60*	53,70
		$\pm m$	1,84	1,58	1,37
	Т-хелперы	М	25,70	20,10*	24,20
		$\pm m$	1,59	0,84	1,27
	Т-супрес.	М	14,40	18,60*	16,80
		$\pm m$	1,45	0,92	0,84
Овцы	Е-РОК	М	52,60	41,60*	53,70
		$\pm m$	0,84	0,58	1,37
	Т-хелперы	М	25,70	20,10*	24,20
		$\pm m$	0,59	0,84	1,27
	Т-супрес.	М	14,40	18,60*	16,80*
		$\pm m$	0,95	0,92	0,64
В-ЛИМФОЦИТЫ					
Свиньи	М	17,40	29,30*	17,22	
	$\pm m$	1,70	1,89	1,07	
Овцы	М	18,50	24,10*	18,90	
	$\pm m$	0,81	1,49	1,08	

*) показатели достоверны по отношению к контрольной группе ($P \leq 0,05$).

Инвазирование свиней сопровождалось значительной активизацией реакции супрессоров в крови, их содержание превосходило контрольные значения в 1,3 раза (на 4,2 %).

Изменения значений Т-клеток в крови свиней при обнаружении спонтанной инвазии в сентябре были недостоверны. Общее количество Т-клеток было выше контроля на 1,2 %, Т-хелперов – равно уровню контроля, а Т-супрессоров – выше на 1,4 %.

У овец, зараженных цистицеркозом, выявленных в июне и в сентябре, регистрировали аналогичные изменения Т-клеток, что и у свиней.

В-система иммунитета у свиней, зараженных спонтанным цистицеркозом в начале лета, изменяла свою активность. Спонтанно зараженные животные имели $29,30 \pm 1,89$ % изучаемых клеток, что в 1,5 раза выше контроля (табл. 6). Однако у свиней, в организме которых обнаруживали тонкошейные финны в сентябре, количество В-клеток было равно $17,20, \pm 1,07$ %, что соответствовало контрольным значениям.

Подобным образом изменялась динамика ЕАС-лимфоцитов в крови овец, спонтанно зараженных цистицеркозом. Если у животных контрольной группы их уровень находился в пределах от $18,50 \pm 0,81$ %, то при цистицеркозной инвазии, диагностируемой в июне, содержание ЕАС-клеток было выше, по сравнению с контролем в 1,3 раза (на 5,6 %). У овец, пораженных тонкошейными финнами, кровь которых исследовали в сентябре, число В-клеток равнялось $18,90 \pm 1,08$ %, что соответствовало контрольным значениям.

Таким образом, нами изучены изменения пропорций и соотношений иммунных клеток в крови сельскохозяйственных животных, спонтанно зараженных цистицеркозом. Показаны более рельефные изменения в количестве изучаемых клеток крови цистицеркозных животных при их исследовании в июне.

Анализируя данные по изучению иммунного статуса у свиней и овец, спонтанно зараженных цистицеркозом (*S.taenuicollis*) можно отметить повышение числа Т-супрессоров и понижение Т-хелперов в начале пастбищного сезона. С другой стороны, в эти месяцы у зараженных животных повышается число В-клеток, что может говорить о повышении продукции клеток, готовых к специфическому ответу хозяина на белковые антигены гельминтов. В условиях понижения количества Т-хелперов В-лимфоциты могут брать на себя часть их функций, в частности представлять антигены в иммуногенной форме для наивных Т-клеток. В конце пастбищного сезона подобные физиологические явления в организме хозяина, очевидно, уравниваются, балансируя в новых условиях антигенной стимуляции, и большинство цифровых показателей иммунных клеток не отличается от контрольных значений.

Анализируя экспериментальные данные по изучению иммунного статуса: показатели естественной резистентности, динамика Е-РОК-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров, ЕАС-лимфоцитов при цистицеркозе свиней и овец, можно прийти к заключению о развитии в организме хозяев дисбаланса в активности различных компонентов иммунной системы. Вполне возможно, что имеет право на существование предположение о развитии вторичных иммунодефицитов у хозяина в первые дни инвазии. Однако в целом к 60 дню инвазии,

когда в организме животных развились инвазионные цистицерки, соотношение компонентов иммунной системы хозяина при разной интенсивности инвазии незначительно отличается от таковых у неинвазированных животных. Тем не менее, на наш взгляд, можно говорить о формировании биологического равновесия. Развитие личинок тений в промежуточном хозяине сопровождается проникновением онкосфер в толщу слизистой оболочки. С током крови через систему воротной вены они заносятся в печень, затем достигают места своего обитания, а развиваются чаще всего на саленке и брыжееке. По нашим данным и результатам исследований П.С. Ивановой с соавт. (1956), молодые цистицерки в первую неделю после инвазии находятся в паренхиме печени под печеночной капсулой. По данным П.С. Ивановой с соавт., размеры личинок в 10-дневном возрасте равны 0,2 – 0,6 x 0,4 – 2,0 мм; в 13-дневном 1,0 – 3,0 x 2,0 – 5,0 мм; в 32-дневном от 3,0 до 24 мм.

Таким образом, документированные нами изменения процентного соотношения и количества Т-клеток, их популяций и В-лимфоцитов зависели от времени миграции и роста цистицерков. Считаем, что изменение естественной резистентности и количественного состава клеточных звеньев иммунитета при экспериментальной инвазии овец и свиней было вызвано в начале инвазии миграцией и ростом метацестод, а после 30-го дня – развитием сколекса, формированием крючьев и приобретением личинкой инвазионных свойств. Незначительные изменения основных параметров иммунитета после 60-го дня, очевидно, обусловлены реактивностью системы защиты хозяина, стремящейся установить новое биологическое равновесие.

Морфометрический анализ динамики площадей структурных компонентов иммунокомпетентных органов

В лимфатическом узле свиней, экспериментально зараженных цистицеркозом, регистрировали увеличение площади вторичных лимфатических фолликулов (со светлыми центрами): к 30 суткам в 1,76 раза (на 1,4 %), к 90 суткам – их площадь составляла $5,20 \pm 0,17$ %, что на 0,2 % меньше контрольных значений (табл. 7). Площадь первичных фолликулов (без светлых центров) к 30 суткам эксперимента уменьшилась в 1,4 раза. К 90 суткам эта разница площадей составляла 1,33 %. Площадь мякотных тяжей в лимфатическом узле свиней, зараженных цистицеркозом, изменялась неоднозначно: к 30 суткам инвазии в 1,32 раза (на 2,6 %) меньше, а к 90 суткам – выше на 0,7 %.

Площадь паракортикальной зоны уменьшилась, по сравнению с аналогичным показателем здоровых животных контрольной группы, на 30-е сутки в 2 раза (на 2,4%), к концу опыта паракортикальная зона превосходила контроль на 0,4%.

Изменения площадей лимфатических фолликулов, мякотных тяжей и паракортикальной зоны сопровождались параллельным расширением площади коркового плато лимфатического узла. К 30 суткам экспериментального заражения она расширилась по сравнению с контрольным уровнем в 1,44 раза (на 8,5 %), к 90 суткам – в 1,79 раза (на 15,0 %).

В лимфатическом узле овец контрольной группы на долю коркового плато органа приходилось $17,60 \pm 0,85$ %, лимфатических узелков без светлых центров – $7,12 \pm 0,48$ %, со светлыми центрами – $4,87 \pm 0,15$ %, мякотных тяжей – $9,40 \pm 0,72$ %, паракортикальной зоны – $9,10 \pm 0,55$ %.

У животных опытной группы к 30 суткам инвазии площадь первичных лимфатических фолликулов уменьшилась в 1,6 раза (на 4,42 %), вторичных, наоборот, увеличилась на 0,4 %, мякотных тяжей уменьшалась в 1,23 раза (на 1,8 %), паракортикальной зоны уменьшалась в 1,9 раза (на 4,6 %). К концу опыта площадь фолликулов без светлых центров была выше контрольной цифры на 0,18 %, мякотных тяжей – на 8,4% или в 1,95 раза, паракортикальной зоны на 1 % выше, чем контрольные значения. Узелки со светлыми центрами к 90 суткам занимали одинаковую площадь с контролем.

Таблица 7

Динамика площадей структурных компонентов брыжеечного лимфатического узла при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец (n=10)

Группы животных	Статистика	Сроки исследования, дни	Корковое плато, %	В-зона, %			Паракортикальная Т-зона, %
				Лимфоидные фолликулы		Мякотные тяжи	
				первичн.	вторичн.		
Свиньи	M	Контроль	18,90	6,74	5,10	10,60	8,70
	±m		1,05	0,94	1,15	1,40	0,85
	M	30	27,40*	4,90*	6,90	8,00*	4,30*
	±m		1,25	0,96	0,78	0,88	0,95
	M	90	33,90*	5,41	5,20	11,30	9,10
	±m		1,16	0,60	0,87	0,81	0,76
Овцы	M	Контроль	17,60	7,12	4,87	9,40	9,10
	±m		0,85	0,78	0,95	0,72	0,85
	M	30	25,20*	4,70*	5,10	7,60*	4,50*
	±m		0,99	0,62	0,80	0,81	0,71
	M	90	30,80*	7,30	4,90	8,80	10,10
	±m		1,56	0,42	0,50	0,49	0,85

*) показатели достоверны по отношению к контрольной группе ($P \leq 0,05$)

Уменьшение площади В- и Т-зависимых зон лимфатического узла овец опытной группы сопровождалось расширением площади, занимаемой корковым плато органа: к 30 суткам эксперимента в 1,43 раза (на 7,6 %), к 90 суткам – в 1,75 раза (на 13,2 %).

Таким образом, экспериментальное заражение свиней и овец цистицеркозом вызывало неоднозначную динамику изменения в структурах лимфатического узла, в частности относящихся к Т- и В-системам иммунитета. При развитии иммунного ответа на инвазию цистицерками в лимфатических фолликулах формировались центры размножения, что приводило к увеличению площадей вторичных фолликулов на 30-е сутки. К моменту формирования инвазионных цистицерков площади В- и Т-зависимых зон лимфатического узла не имели достоверных различий с таковыми контрольной группы животных. Корковое

плато на 90-е сутки превосходило контрольные значения на 15 % у свиней и на 13,2 % у овец.

В селезенке свиней мы исследовали изменения площади белой пульпы. В белой пульпе проводили морфометрический анализ площади лимфатических узелков без светлых и со светлыми центрами – В-зоны и площади периваскулярных лимфоидных муфт, относящихся к Т-зоне узла (табл. 8).

У свиней, зараженных цистицеркозом, к 30 суткам инвазии площадь белой пульпы уменьшилась в целом в 1,58 раза (на 9,6 %). В белой пульпе площади лимфатических фолликулов без светлых центров уступали контрольным данным в 1,96 раза, а фолликулы со светлыми центрами превосходили контроль в 1,2 раза, достигая 5,8%. Площадь периваскулярных лимфоидных муфт уменьшалась в 1,4 раза (на 2,0%).

Таблица 8

Динамика площадей структурных компонентов селезенки при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец (в %, n=10)

Группы животных	Сроки исследования, дни	Стат. показатель	Красная пульпа	Белая пульпа	Т-зона периваскулярная муфта	Лимфатические фолликулы – В-зона	
						первичн.	вторичн.
Свиньи	Контроль	M	69,20	25,90	6,90	16,70	4,91
		$\pm m$	1,76	1,37	0,91	0,91	0,73
	30	M	76,90*	16,33*	4,90*	8,50*	5,80
		$\pm m$	0,97	0,67	0,38	1,04	0,17
	90	M	84,70*	25,40	6,40	16,00	4,75
		$\pm m$	1,47	0,87	0,61	0,78	0,92
Овцы	Контроль	M	70,20	24,80	7,10	15,41	5,20
		$\pm m$	0,81	1,17	0,79	0,83	0,72
	30	M	79,30*	18,30*	5,00*	7,10*	6,30
		$\pm m$	0,35	0,65	0,69	0,69	0,62
	90	M	68,20	25,60	7,20	14,90	4,90
		$\pm m$	2,17	1,14	0,75	0,86	0,75

*) показатели достоверны по отношению к контрольной группе ($P \leq 0,05$)

Площадь красной пульпы органа, напротив, расширилась в 1,11 раза (на 7,7 %). К 90 суткам инвазии площадь лимфатических узелков без светлых центров равнялась 16,0 %, что уступало контрольной цифре только на 0,7 %. Вторичные лимфатические фолликулы имели площадь, близкую к контрольным значениям (4,75 %). Площадь периваскулярных лимфоидных муфт уступала фону на 0,5 % и равнялась 6,40 %. Площадь красной пульпы в селезенке свиней опытной группы, зараженных цистицеркозом, к концу опытов превысила контрольную цифру здоровых животных в 1,22 раза (на 15,5 %). К моменту достижения цистицерками инвазионной стадии белая пульпа занимала площадь, практически равную контрольным значениям.

Иммунорфологические перестройки в селезенке овец при экспериментальном цистицеркозе были подобны таковым в селезенке свиней.

Изменения в селезенке цистицеркозных свиней и овец свидетельствовали, прежде всего, о нарушении формирования гуморального иммунного ответа продукции специфических иммуноглобулинов в первые 30 суток инвазии.

В тимусе контрольных и опытных животных мы проводили морфометрические исследования изменений в корковом и мозговом веществе органа (табл. 9).

На долю коркового вещества тимуса контрольных свиней приходилось: $55,3 \pm 1,42$ %, овец – $51,8 \pm 1,89$ %, мозгового – $44,7 \pm 1,42$ % и $48,2 \pm 0,76$ %, соответственно.

Таблица 9

Динамика площадей структурных компонентов тимуса при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец (в %, $P < 0,05$)

Группы	Структура органа	Стат. показ.	Сроки исследования в днях после заражения		
			Фон	30	90
Свиньи	Корковое	M	55,30	40,70	30,33
		$\pm m$	1,42	0,91	1,45
	Мозговое	M	44,70	59,33	69,70
		$\pm m$	1,42	0,88	1,80
Овцы	Корковое	M	51,80	36,30	20,20
		$\pm m$	1,89	1,42	1,33
	Мозговое	M	48,20	63,70	79,80
		$\pm m$	0,76	0,91	2,32

На 30-й день экспериментального заражения отмечали уменьшение площади коркового вещества вилочковой железы при расширении площади мозгового вещества. Корковое вещество тимуса инвазированных свиней уступало таковому контрольной группе в 1,35 раза (на 14,6 %), у овец – в 1,42 раза (на 15,5 %). К 90 суткам опыта площадь коркового вещества тимуса опытных животных уступала таковой контрольных: у свиней в 1,82 раза (на 25,0 %), у овец – в 2,56 раза (на 31,6 %). Площадь мозгового вещества увеличивалась на 30-е сутки до $63,7 \pm 0,9$ %, а на 90-е сутки – $79,8 \pm 2,32$ %.

Таким образом, цистицеркоз свиней и овец вызывал изменения тимуса в виде уменьшения площади коркового вещества, имеющего непосредственное отношение к синтезу Т-лимфоцитов, что подтверждает нарушения в клеточном звене иммунитета, регистрируемые в предыдущих разделах работы.

Анализ миелограммы костного мозга. Как видно из табл. 10, у свиней контрольной группы клетки гранулоцитарного ростка без эозинофилов составили $48,4 \pm 1,45$ %, эозинофилы – $1,70 \pm 0,17$ %, клетки эритроидного ростка – $45,30 \pm 1,76$ %, лимфоидные клетки – $6,40 \pm 0,70$ %, моноциты, мегакариоциты и плазматические клетки – $2,10 \pm 0,25$ %.

У зараженных свиней установлено уменьшение продукции клеток гранулоцитарного ростка без эозинофилов. К 30 суткам их количество снижалось в 1,58 раза (на 17,8 %). К 90 суткам экспериментального заражения клетки зернистого ростка без эозинофилов количественно восстанавливались до контрольных значений – $44,90 \pm 1,24$ %. Количество эозинофилов к 30 дню инвазии, на-

оборот, увеличивалось до $21,41 \pm 1,52$ % (в 20 раз), затем уменьшалось и к 90 дню опыта оказалось равным 2,7 %, что было в 2 раза выше контроля.

Содержание клеток эритроидного роста костного мозга свиней опытной группы прогрессивно снижалось. На 30-е сутки эксперимента их уровень был ниже, чем в контроле в 1,76 раза (на 19,6 %), к 90 суткам инвазии функции эритропоэза частично восстанавливались, и число клеток эритроидного роста равнялось $30,20 \pm 0,99$ %, что в 1,5 раза ниже контрольных значений.

В костном мозге опытных свиней регистрировалось снижение количества лимфоидных клеток: к 30 дню – в 1,6 раза (на 2,4 %), к 90 дню их количество равнялось $5,30 \pm 0,45$ %, что ~ 1,2 раза меньше, чем контрольные показатели. Количество моноцитов, мегакариоцитов и плазматических клеток уменьшалось к 30 дню – в 2,33 раза (на 1,2 %), к 90 дню их количество достигало 1,6 %, что в 1,3 раза меньше контрольных значений.

Изменения в костном мозге зараженных цистицеркозом овец были аналогичны миелограмме костного мозга зараженных свиней. У неинвазированных овец доля клеток зернистого роста без эозинофилов составила $42,90 \pm 1,65$ %, эозинофилов – $1,80 \pm 0,15$ %, клеток эритроидного роста – $46,23 \pm 1,86$ %, лимфоидных клеток – $6,90 \pm 0,23$ %, моноцитов, мегакариоцитов и плазмоцитов – $1,61 \pm 0,16$ %. У зараженных животных уже к 30 суткам опыта регистрировали иммуноморфологические изменения. Клетки эритроидного роста к этому сроку исследования уступали контролю в 1,53 раза (на 16,1 %), зернистого роста (базофилы и нейтрофилы) – в 1,54 раза (на 15,2 %), лимфоидные клетки – в 2,02 раза (на 3,6 %), моноциты, мегакариоциты и плазматические клетки – в 2,37 раза (на 1,1 %). При этом уровень эозинофилов увеличился к 30 дню эксперимента в 13,61 раза (на 22,7 %).

Таблица 10

Миелограмма костного мозга при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец

Группы	Сроки исследования, дни	Стат. показат.	Клетки гранулоцитарного роста		Клетки эритроидного роста	Лимфоидные клетки	Моноциты, мегакариоциты, плазмоциты
			базофилы, нейтрофилы	эозинофилы			
Свиньи	Контроль	M	48,40	1,71	45,33	6,40	2,10
		$\pm m$	1,45	0,12	1,76	0,70	0,25
	30	M	30,60*	21,41*	25,70*	4,00*	0,98*
		$\pm m$	1,25	1,52	0,65	0,58	0,12
	90	M	44,90	2,67*	30,20*	5,30	1,60
		$\pm m$	2,24	0,89	0,99	0,45	0,38
Овцы	Контроль	M	42,90	1,80	46,23	7,10	1,90
		$\pm m$	1,65	0,15	1,86	0,38	0,27
	30	M	27,71*	24,50*	30,10*	3,53*	0,80*
		$\pm m$	1,24	0,87	1,24	0,29	0,15
	90	M	40,33	2,94*	36,70	6,90	1,61
		$\pm m$	1,67	0,83	1,93	0,23	0,16

*) показатели достоверны по отношению к контрольной группе ($P \leq 0,05$)

Таким образом, миеелограмма костного мозга при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец имела специфические изменения. На 30-е сутки зарегистрировано достоверное снижение количества базофилов, нейтрофилов, клеток эритроидного ростка, лимфоидных клеток, а также моноцитов, мегакариоцитов и плазмоцитов ($P < 0,05$). В эти же сроки количество эозинофилов возрастало ~ в 20 раз. На 90-е сутки инвазии разница между количеством большинства исследуемых клеток у инвазированных и неинвазированных цистицерками животных была недостоверна ($P > 0,05$). Повышение количества эозинофилов оставалось достоверным на всем протяжении эксперимента и на 90-е сутки было в 1,56 раз выше контрольных значений. Количество клеток эритроидного ростка было ниже контрольных значений в 1,3 раза.

По нашему мнению, данные о нарушениях иммунной реактивности костного мозга указывают, что при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец возможно развитие патологических процессов, приводящих к истощению иммунной системы и развитию вторичных иммунодефицитов.

С другой стороны, повышение уровня ауто-РОК лимфоцитов при экспериментальном цистицеркозе овец указывает на развитие популяций Т-клеток с рецепторами, взаимодействующими с собственными антигенами, что обеспечивает аутоиммунное направление патофизиологических процессов.

По нашему мнению, часть механизмов регуляции активности защитных реакций хозяина, их акцентов и направлений осуществляется через общие антигенные структуры цистицерков и тканей зараженных животных. Феномен наличия общих белков и рецепторов в системе паразит-хозяин обуславливает возможность жизнедеятельности инвазионных агентов в организме животных. Эффективность данного феномена обуславливают следующие факторы: а) паразит не является сильным раздражителем для иммунной системы хозяина; б) паразит способен осуществлять контроль над процессами супрессии или активации того или иного звена иммунитета; в) паразит и хозяин могут формировать адаптивно приобретенное биологическое равновесие.

По нашему мнению, характер биологического равновесия в условиях длительной антигенной стимуляции при метацестодах можно описать следующим образом:

а) исходное — до заражения гельминтами, при котором наблюдается ауто-толерантность и не существует функционально-специфических изменений в физиологии клеток иммунной системы;

б) адаптивное — в момент развития инвазии, при котором, как правило, наблюдается полноценный иммунный ответ со стороны хозяина и иммунобиологическая перестройка во всех компетентных органах, а также включение механизмов его устранения со стороны гельминтов;

в) адаптивно-приобретенное или вторично-исходное — при котором, даже если не произошло устранения раздражителя, иммунный ответ хозяина, благодаря защитным механизмам паразита, теряет свою эффективность и полноценность по отношению к гельминтам, практически возвращается в исходное состояние, однако, контроль над активностью гельминтов передается иммунным клеткам памяти и идиотип-антиидиотипической системе хозяина.

ИММУНОДИАГНОСТИКА ЦИСТИЦЕРКОЗОВ И ТЕНИИДОЗОВ ЖИВОТНЫХ

Кровь высших животных, наряду с доставкой питательных веществ, газов, гуморальных факторов выполняет функцию транспорта средств защиты и сигнальных молекул чужеродного вторжения в организм хозяина. Тесты, разработанные на обнаружение антигенов гельминтов или антител хозяина к ним, в биологических субстратах могут быть хорошей альтернативой существующим традиционным методам диагностики паразитозов. Необходимость проведения работ в этом направлении обостряется зависимостью результатов копрологических исследований от стадии развития гельминтов, физиологического состояния организма хозяина, длительности срока созревания паразитов до половозрелой стадии (несколько месяцев). Исходя из этого, мы определили принципиальные подходы к иммунодиагностике цестодозов и оценили эффективность конкретных диагностических схем для выявления их возбудителей у промежуточных и дефинитивных хозяев.

ИФР (ELISA) и дот-ИФР (dot-ELISA) в диагностике цистицеркозов овец и свиней

ИФР для выявления антител в крови при цистицеркозах овец и свиней

Нами проведены серии экспериментов по основным характеристикам тест-систем: чувствительности, специфичности и воспроизводимости тестов.

При выборе оптимальной концентрации антигена на полистироловых планшетах, их сенсibilизировали экстрактом тений *T.hydatigena* (*T.hЭКC1*) с содержанием белка от 1 до 50,0 мкг/мл и проводили реакцию с заведомо положительными сыворотками. Установлено, что оптимальной дозой для сенсibilизации планшетов являлась концентрация антигена 5 – 10 мкг/мл. Аналогичным способом определены оптимальные разведения антигенных экстрактов личинок 4-дневного возраста (*T.hЭКC4*) и клеточных метаболитов личинок гельминтов (*Met.4*). Оптимальные результаты получены при тех же концентрациях антигенов. Для разведения антигена использовали 0,01 М карбонатный-бикарбонатный буфер (рН 9,6). При выборе температурного режима и времени фиксации планшеты выдерживали от 1 до 24 ч при температуре 4 – 37 °С. Установлено, что оптимальным режимом являлась сенсibilизация антигена 10 ч при 4 °С. Антиген вносили в объеме 200 мкл, а все остальные ингредиенты, используемые в реакции (исследуемую сыворотку, конъюгат, субстрат), вносили в объеме 100 мкл в лунку. После сенсibilизации планшет отмывали дистиллированной водой с 0,05 % содержанием твина-20 три раза по 5 мин. Отмывку этим раствором проводили после каждого этапа реакции.

При выборе оптимального разведения исследуемых сывороток их разводили 0,01 М фосфатно-солевым буфером (рН 7,2-7,4 с 0,05 % содержанием твина-20 и 1% лошадиной сыворотки). Мы использовали разведения 1:50, 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400. Был осуществлен поиск разведения, при

котором выявляется максимальное количество слабоположительных сывороток и минимальное количество ложноположительных сывороток крови. В результате нами выбраны разные диагностические титры для овец и свиней — 1:150 и 1:100, соответственно. Инкубировали сыворотки в течение 30 мин при температуре +37 °С или в течение 18 ч в холодильнике при 4°С. Отрицательным и положительным контролем служили сыворотки крови исследуемого вида животных с заранее известными характеристиками в условиях проведения ELISA. Необходимо отметить, что конкретные значения титра сывороток применимы только к данной нерастворимой основе, конкретным антигенам, комплексирующему буферу, условиям сенсibilизации и к рабочему разведению используемого конъюгата.

Установлено, что для разведения конъюгата следует использовать раствор, состоящий из 0,01 М фосфатно-солевого буфера (рН 7,2-7,4) с 0,05% содержанием твина-20 и 1% лошадиной сыворотки. Оптимальным режимом инкубирования были выбраны время 30 мин при температуре +37 °С.

Проявление реакции проводили субстратной смесью из 10 мл цитратного буфера рН 5,0 с добавлением 8 мг ортофенилендиамина и 10 мкл стабилизированной 30%-й перекиси водорода (пергидроля). После проявления (10 мин), реакцию останавливали 50%-ным раствором серной кислоты, которую вносили в объеме 50 мкл на лунку.

Визуальную оценку реакции проводили по интенсивности окрашивания субстрата в лунках. Положительная реакция характеризовалась появлением у субстратной смеси желтого или желто-красного цвета. При отсутствии изменения цвета реакцию оценивали как отрицательную. Сыворотка, результаты ELISA с которой незначительно превосходили по интенсивности окраски отрицательный контроль, считалась сомнительной. Сомнительную сыворотку исследовали повторно титрованием, если при разведении 1:300 сохранился желтый цвет субстрата, то сыворотку считали положительной. При автоматическом учете на многоканальном ридере использовали волну длиной 492 нм. Положительной считали сыворотку, в реакции с которой был получен коэффициент экстинкции оптической плотности от 0,3 и выше, все остальные результаты считали отрицательными. При такой системе учета доказана однозначность оценки реакции при визуальной и инструментальной регистрации результатов.

Дот-ИФР для выявления антител при цистицеркозах свиней и овец

Диагностическую тест-систему дот-ИФР разработали с целью получения эффективного и недорогого метода обнаружения цистицеркозов овец и свиней для работы в полевых условиях. В работе использовали нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0,22 μm фирмы Serva, антиген (Met.4), а также сыворотки крови зараженных и незараженных цистицеркозами животных.

В результате аналогичных с ИФР экспериментов нами были получены оптимальные диагностические режимы постановки реакции.

Для сорбции антигена на мембране в качестве комплексирующего буфера использовали 0,01 М карбонатно-бикарбонатный (рН 9,6). Антиген наносили на доты в объеме 3 мкл при концентрации 330 мкг/мл. Мембраны высушивали 15

мин при 56 °С. Блокирование свободных участков проводили в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) с 10%-й лошадиной сывороткой в течение 10 ч при 4 °С. Мембрану отмывали один раз 5 мин в отмывающем растворе (0,01 М фосфатно-солевой буфер с 0,05%-ным содержанием твина-20).

На следующем этапе исследуемые сыворотки разводили 1:20 в 0,01 М ФСБ 7,4 и с 0,05%-ным содержанием твина-20. Наносили на мембрану в объеме 3 мкл/дот. Инкубирование проводили при комнатной температуре во влажной камере, которая состояла из чашки Петри с тонким слоем поролона (0,5 см) и листа фильтровальной бумаги на нем, смоченных отмывающим раствором. Инкубирование с сыворотками продолжалось в течение 1 ч. По окончании инкубации несвязавшиеся компоненты удаляли с мембраны трехкратным отмыванием ее по 5 мин в отмывающем растворе.

Конъюгат применяли в рабочем разведении, которое устанавливали в предварительных экспериментах для каждой новой серии. Конъюгат разводили 0,01 М фосфатно-солевым буфером рН 7,4 с 0,05%-ным содержанием твина-20. Мембрану помещали в раствор конъюгата и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем отмывали.

На заключительном этапе мембрану помещали в раствор субстратной смеси и выдерживали 10 мин в темном месте. Субстратную смесь готовили следующим образом: 5 мг 3,3'-диаминобензидина растворяли, тщательно перемешивая, в 20 мл 0,1 М трис-НСl буфера (рН 7,6) и фильтровали через бумажный фильтр. Установлено, что раствор можно хранить не более 3 дней при температуре 4 °С. Непосредственно перед употреблением в раствор субстрата добавляли 10 мкл 30%-й H_2O_2 . После проявления реакцию останавливали промыванием мембраны в водопроводной воде.

Оценку реакции проводили визуально по интенсивности окрашивания дотов в сравнении с контрольными сыворотками. Результат считали отрицательным, если на месте нанесения сыворотки пятно не проявлялось.

Результат считали положительным, если на месте нанесения сыворотки появилось коричневое пятно с четким контуром.

Использовали следующую шкалу оценки:

«+++» – сильноположительная реакция – темно-коричневое пятно;

«++» – положительная реакция – коричневое пятно;

«+» – слабоположительная реакция – светло-коричневое пятно;

«-» – отрицательная реакция – пятно не проявляется.

Сравнительная диагностическая эффективность ИФР и дот-ИФР при цистицеркозах сельскохозяйственных животных

Для оценки диагностической эффективности двух тестов были использованы антигены Met.4 и T.hЭКС1, сыворотки крови от одних и тех же животных. Как видно из табл.11 диагностика спонтанного цистицеркоза овец и свиней была эффективной в обоих тестах. При изучении сывороток крови от 100 овец, незараженных цистицеркозом, 12 дали положительные ответы в дот-ИФР с антигеном метаболитов клеток (Met.4) и 14 – с экстрактом концевых фрагментов тений (T.hЭКС1). Аналогичные результаты были получены и при исследовании

этой коллекции сывороток крови в ИФР на пластике. Спонтанный цистицеркоз овец обеспечивал у 8 из 10 животных положительный ответ в дот-ИФР с обоими антигенами, на планшетах с Met.4 чувствительность теста оказалась несколько ниже – 70% (табл. 9). С гетерологичной инвазией в обоих тестах были получены одинаковые результаты с исследуемыми антигенами. У овец, спонтанно зараженных эхинококкозом, специфичность тестов с Met.4 составила 90 %, с антигеном ТhЭКС1 – 80 %. Сыворотки крови спонтанно зараженных фасциолезом овец не имели антител к антигенам тений, и специфичность тест-систем составила 100 %. При исследовании сывороток крови от овец, пораженных мониезиями, с помощью тестов с антигеном Т.hЭКС1 получили 90 % специфичности. Полученные результаты мы объясняем большим количеством общих белков близких в филогенетическом отношении тений и мониезий и отсутствием таковых (сходных по строению иммуногенных компонентов) у трематод с цестодами. К тому же, антигенный экстракт, который дал одну положительную реакцию из 10 с сыворотками крови от мониезиезных овец был получен из концевых проглоттид тений – т.е. структуры червей, паразитирующих в желудочно-кишечном тракте, вполне естественно, имели общие антигенные компоненты.

Таблица 11

Специфичность и чувствительность дот-ИФР и ИФР при спонтанных инвазиях гельминтами овец и свиней

Группы животных	дот-ИФР, Met/4	дот-ИФР, ТhЭКС1	ИФР, Met/4	ИФР, TsЭКС1
ОВЦЫ заражение:				
<i>T.hydatigena</i> n=10	8	8	8	8
<i>E.granulosus</i> n=10	1	2	1	2
<i>F.hepatica</i> n=10	0	0	0	0
<i>M.expansa</i> n=10	0	1	0	1
Незараженные n=100	12	14	12	14
СВИНЬИ заражение:				
<i>T.hydatigena</i>	9	9	9	9
<i>E.granulosus</i> .n=5	1	1	1	1
<i>F.hepatica</i> . n=10	0	1	0	1
<i>A.suum</i> n=10	0	0	0	0
Незараженные n=100	14	16	14	16

Результаты, полученные с сыворотками крови свиней, отличались большей интенсивностью протекания реакций. Из 100 незараженных животных 15 сывороток прореагировали отрицательно, из 10 зараженных – 9 сывороток прореагировали положительно. Наиболее высокими диагностическими качествами обладал тест на основе дот-ИФР с антигеном Met.4. Учитывая все группы незараженных *S.taenuicollis* свиней, специфичность данного теста составила 88 %, чувствительность группы животных, зараженных *S.taenuicollis*, составила 90 %. Дот-ИФР с антигеном Т.hЭКС1 при чувствительности 90 %, показал более низкую специфичность – 87,4 %. ИФР на пластике с сыворотками крови свиней также протекала более интенсивно, чем с таковыми от овец. При этом антиген Met.4 показал специфичность 88,5 %, чувствительность 90 %, а антиген Т.sЭКС1 при специфичности 86,2 % показал чувствительность 90 %.

Таким образом, на основании проведенных сравнительных исследований установлена практически равная диагностическая эффективность дот-ИФР и ИФР. Оба диагностических теста могут быть рекомендованы к применению для выявления неблагополучного по цистицеркозу поголовья овец или свиней. Однако дот-ИФР более проста в постановке и лучше приспособлена для работы в полевых условиях, так как не требует электрооборудования и может применяться в малооснащенных лабораториях.

ИФР и дот-ИФР в диагностике тениидозов плотоядных

При обследовании 1000 собак были обнаружены 163 животных, пораженных, гельминтами, что составляет 16,3 %. Из них 62 собаки в желудочно-кишечном тракте имели цестод, в том числе: 39 – *Taenia* sp., 12 – *Dipylidium caninum*, 4 – *Diphyllobothrium latum*, 5 – *Mesocestoides lineatus*, 2 – *E. granulosus*. 83 собаки были поражены нематодами, паразитирующими в тонком кишечнике – *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma caninum*, *Uncinaria stenocephala*. Нематоды, паразитирующие в толстом отделе кишечника, были представлены *Trichocephalus vulpis* – 12 случаев, а также у 6 собак были выявлены гельминты р. *Dirofilaria*, паразитирующие в кровеносной системе. От всех обследованных собак были получены сыворотки крови и пробы фекалий.

Определение антигенов тений и антител к ним в крови плотоядных

Кровь у собак брали из вены (*v. cephalica*) затем получали сыворотку, которую хранили при температуре -20°C . Для обнаружения сывороточных антител в крови гельминтозных собак использовали метод ELISA с антигеном из концевых проглоттид *T. hydatigena* (ThЭКС1). Для обнаружения антигенов в крови на пластик сорбировали антитела кроликов, иммунизированных этим же антигенным экстрактом.

Установлено, что оптимальным разведением сыворотки крови является 1:25 в фосфатно-солевом буфере с 0,05 % твином-20. В лунки с заранее сорбированным антигеном или антителами добавляли 100 мкл сыворотки крови собак. Инкубировали в термостате в течение 1 ч при 37°C . Затем планшет пятикратно промывали ФСБ с твином-20. Конъюгат добавляли в необходимом разведении, для чего осуществляли подтитровку. В работе для определения антител использовали конъюгат – антитела кролика, меченные пероксидазой против IgG собак, который разводили 1:1000. При определении антигенов использовали специально приготовленный конъюгат – антитела кролика к TsЭКС1, меченные пероксидазой хрена.

Установлено, что в качестве субстрата необходимо использовать раствор 3,3'-диаминобензидина. Оптимальным режимом инкубирования являлась экспозиция 15 мин при комнатной температуре в темном месте. В лунки вносили по 100 мкл субстрата. В качестве стоп-реагента вносили – 50 % H_2SO_4 и через 2 мин измеряли оптическую плотность при $\lambda=492$ нм. Установлено, что учет реакции был оптимальным, когда ответ считался положительным, если значение коэффициента оптической плотности (E) $\geq 0,3$ при обнаружении IgG. При обнаружении антигенов реакция считалась положительной при $E > 0,3$.

При исследовании сывороток крови на наличие антигенов с помощью ИФР чувствительность метода составила 49 %, специфичность – 98 %. При обнаружении антител крови к антигенам гельминтов чувствительность составила 72 %, а специфичность – 96,6 %. Специфичность проверяли на сыворотках крови от собак с гетерологичной инвазией, а чувствительность – на сыворотках от собак, инвазированных тениями (табл. 12).

Таблица 12

Эффективность иммунодиагностического исследования биологических субстратов зараженных гельминтами собак с помощью ИФР (ELISA)*

Виды гельминтов	Сыворотка крови		Пробы фекалий		Количество обследо- ванных собак
	А/Г	А/Т	А/Г	А/Т	
<i>Taenia</i> sp.	19	28	33	21	39
<i>D.caninum</i>	1	2	1	1	12
<i>D.latum</i>	0	0	0	0	4
<i>M.lineatus</i>	0	1	1	1	5
<i>E.granulosus</i>	0	0	2	0	2
Нематоды 1	1	3	0	0	83
Нематоды 2	0	0	0	0	12
Нематоды 3	0	0	0	0	6

*) Нематоды: 1 – паразитирующие в тонком отделе кишечника плотоядных; 2 – паразитирующие в толстом отделе кишечника; 3 – паразитирующие в кровеносных сосудах плотоядных.

Антитела обнаруживали у 28 из 39 собак, зараженных тениями. Причем из 11 собак, у которых не были выявлены антитела, 5 положительно реагировали на присутствие антигена. Среди животных, которые имели антитела к тениям (28), только 12 положительно реагировали на антигены. Данный факт мы объясняем конкурентными взаимоотношениями антиген-антитело и связыванием большинства детерминант активными центрами еще в организме хозяина. Условия постановки ИФР, очевидно, не обеспечивают полного разрушения уже существующих комплексов. Возможно, у большинства зараженных собак в сыворотке крови отсутствуют свободно циркулирующие антигены. Тем не менее, учитывая многогранность и неоднозначность взаимодействия антител и антигенов для повышения эффективности диагностических тестов, по нашему мнению, сыворотку крови необходимо исследовать на наличие антител и антигенов. Такой подход, во-первых, повышает диагностическую эффективность тестов, во-вторых, наличие свободно циркулирующих антигенов тений может свидетельствовать о нарушении иммунной системы, которая не справляется с утилизацией паразитарных антигенов.

Определение копроантигенов и антител к ним

Фекалии собирали по 2,0 г в пластиковые пробирки, смешивали 1:1 с фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,3 % твин-20 (Sigma). Затем пробы центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин при комнатной темпера-

туре. Супернатант разливали по 0,5 мл и хранили при температуре -20°C до использования.

Антигены в фекалиях с помощью ИФР выявляли от 33 из 39 собак, зараженных *Taenia* sp. В надосадочной жидкости фекальных проб от 39 зараженных тенидозами собак 21 имела антитела к тениям. Причем в 5 ложноотрицательных случаях инвазия совпадала с не достигшими половой зрелости гельминтами, а в 2 других – количество паразитов не превышало одной особи.

При эхинококковой инвазии собак (*E. granulosus*) мы обнаруживали копроантигены в фекалиях, однако антигены гельминтов, как и антитела к ним в крови не выявлялись. Возможно, именно отсутствие или проникновение незначительного количества антигенных молекул половозрелых теней *E. granulosus* в кровь definitivoного хозяина обуславливает неярко выраженный антительный ответ собак, а также слабую патогенность этих паразитов (табл. 10).

Основными причинами разработки дот-ИФР на поиск копроантигена тениид собак являлись его экономичность в расходе реактивов и возможность определять инвазию до начала выделения яиц гельминта во внешнюю среду. В предложенном варианте дот-ИФР является родоспецифичным тестом.

Установлено, что гипериммунную сыворотку кролика против концевых проглоттид *T. hydatigena* необходимо разводить карбонатно-бикарбонатным буфером до 700 мкг/мл. Полученный раствор имел оптимальную активность при нанесении антител в объеме 3 мкл, на участок нитроцеллюлозной мембраны. Затем мембрану высушивали в течение 15 мин при температуре 56°C .

Определено, что оптимальное блокирование (инактивация) свободных участков мембраны проводится 10%-й лошадиной сывороткой 18 ч при температуре 4°C .

Образцы фекалий смешивали с 0,15 М фосфатно-солевым буфером (рН 7,2), содержащим 0,3 % твина-20 в пропорциях 1:1,5. Полученную суспензию центрифугировали при 2000g в течение 30 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость (1,0 мл) переносили в пробирку и исследовали. Установлено, что исследуемые образцы необходимо вносить в объеме 150 мкл в лунки планшета с дотом нитроцеллюлозной мембраны и инкубировать в течение 90 мин при комнатной температуре. Затем дот нитроцеллюлозной мембраны необходимо промыть фосфатно-солевым буфером.

Конъюгат разводили (предварительно определив оптимальные пропорции) в растворе с 0,15М ФСБ (рН 7,2) с 0,05 % твин-20. Инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем отмывали.

Визуализацию реакции осуществляли субстратной смесью на основе диаминобензидина. Нитроцеллюлозные мембраны помещали в раствор субстратной смеси на 10 мин при комнатной температуре. На последнем этапе реакцию останавливали промыванием мембран водопроводной водой.

Учет результатов проводили визуально по интенсивности окрашивания точек-дотов по сравнению с контрольными.

Шкала оценки реакции:

1. Четкое, темно-коричневое пятно – ярко положительная реакция (++)
2. Светло-коричневое пятно – положительная реакция (+).

3. Пятно не проявляется – отрицательная реакция (-).

Как видно из табл. 13, результаты диагностики тениидозов плотоядных по копроантигену с помощью дот-ИФР превосходили таковые с ИФР на пластике. Чувствительность теста в наших экспериментах составила 87,2 %, при специфичности – 92,3 %.

Таблица 13

Эффективность дот-ИФР на обнаружение копроантигенов тениид собак, зараженных гельминтами

Виды гельминтов	Результаты теста	Количество обследованных собак
<i>Taenia sp.</i>	34	39
<i>D.caninum</i>	1	12
<i>M.lineatus</i>	0	5
<i>E.granulosus</i>	2	2
<i>T.canis</i>	0	20

Две пробы от эхинококковых собак и одна от животных, зараженных *D.caninum*, дали положительный ответ на копроантиген. Данный результат мы объясняем наличием общих антигенов и возможностью перекрестных реакций с антителами, полученными при иммунизации кролика большим набором антигенов экстракта концевых проглоттид тений. Ни у одной из 20 токсокарозных собак в фекалиях не было обнаружено перекрестно реагирующих антигенов тений.

Исходя из вышеизложенного, нами сделано заключение, что дот-ИФР на нитроцеллюлозных мембранах может использоваться, наряду с ИФР на пластике, для диагностики цистицеркозов сельскохозяйственных животных при массовых серозепизоотологических исследованиях в ветеринарной практике. Особенно перспективным нам представляется направление по применению дот-ИФР с целью обнаружения копроантигенов у больных тениидозами собак. В наших экспериментах этим тестом удавалось обнаружить заражение гельминтами за месяц до появления члеников и яиц в фекалиях (в 7 случаях из 9), что актуально при современном развитии мегаполисов и увеличении поголовья собак. Данный подход может обеспечить правильное и своевременное применение антгельминтиков, что приведет к снижению биологической агрессии среды, прежде всего детских площадок, песочниц и территорий школ.

ВЫВОДЫ

1. На основании комплексных исследований сформулированы теоретические положения, характеризующие взаимоотношения паразита и хозяина при цистицеркозах животных, как двусторонняя адаптивная толерантность, обеспечивающая в процессе развития инвазии формирование адаптивно-приобретенного равновесия. Эти состояния в системе «паразит-хозяин» иницируются их белками и рецепторами с общими антигенными свойствами, что вызывает активизацию защитных систем хозяина и тормозит развитие аутоиммунных процессов.

2. Методами физико-химического и иммунохимического анализа дана характеристика белкового спектра гельминтов. Установлено, что экстракт *S.taeniacollis* имеет 26 белковых фракций, из них 18 общих с *S.bovis* и 8 – видоспецифичных. Половозрелые формы *T.hydatigena* имеют всего – 24 белковых фракции, из них 5 являются видоспецифичными; *T.saginata* - 23, из них 4 – видоспецифичные. Показано, что наиболее специфичными, имеющими диагностическое значение, являются фракции с молекулярной массой 70–85 и 20–40 кДа.

3. Установлено, что наиболее эффективной питательной средой для культивирования клеток цистицерков и тений является среда DMEM, на которой через 7 суток культивирования на дне лунок планшетов “Flow laboratories” образуется монослой клеток. Отбор диагностически ценных метаболитов следует проводить на 10-е сутки культивирования.

4. Определена динамика постинвазионного антителигенеза крупного рогатого скота, овец и свиней. Установлено, что при заражении *S.taeniacollis* антитела выявляются в разные сроки (от 10 до 60 суток после начала инвазии) на антигенные компоненты молекулярной массой 12; 18; 20; 27; 40; 43; 60; 64; 68; 90 кДа. Отмечено наиболее выраженное формирование гуморального иммунного ответа у свиней.

5. Установлено, что белки сыворотки крови хозяина имеют общие антигенные свойства с белками гельминтов. В перитонеальной жидкости и крови животных выявлены 4 группы белков с молекулярной массой 30; 67; 70 и 90 кДа, которые взаимодействуют с нормальными антителами. При экспериментальной цистицеркозной инвазии в крови овец продуцируются антитела, способные взаимодействовать с белками собственной сыворотки крови.

6. Определено состояние естественной резистентности при экспериментальном цистицеркозе у свиней и овец в зависимости от стадии и сроков развития паразита. Отмечено, что в течение 30 суток после заражения происходит снижение бактерицидной и комплементарной активности сыворотки крови при одновременном повышении содержания в ней лизоцима. На 60 сутки инвазии показатели естественной резистентности приближались к контрольным значениям.

7. Изучена динамика иммунокомпетентных клеток крови на популяционном и субпопуляционном уровне при экспериментальном цистицеркозе свиней и овец. Установлено, что в начальной стадии инвазии (5-е сутки) во время миграции личинок количество Т-хелперов снижается до $15,85 \pm 1,21$ % при одновременном повышении общего количества Т-лимфоцитов до $58,60 \pm 3,19$ % за счет увеличения Т-супрессоров. Количество В-клеток в эти сроки развития инвазии снижается до $9,30 \pm 1,06$ %. К моменту формирования инвазионной стадии цистицерка (60 – 90-е сутки) не установлено статистически достоверных различий в количестве Т- и В-клеток между контрольной и опытной группами животных ($P > 0,05$).

8. Дана количественная характеристика динамики Е-РОК, их популяций и ЕАС-лимфоцитов в тимусе, лимфатических узлах и селезенке при экспериментальной инвазии цистицерками. Установлено, что общее количество Т-

лимфоцитов на 30 сутки инвазии снижается в 1,7; 2 и 1,8 раза соответственно. Снижение Т-клеток происходит за счет более резкого уменьшения популяции хелперов по сравнению с супрессорами. Отмечено снижение количества В-клеток на 30 сутки инвазии в лимфатических узлах в 1,7, в селезенке в 2,2 раза. На 90 сутки инвазии различие в показателях между контрольной и опытной группами было статистически недостоверным ($P > 0,05$).

9. Проведен анализ морфометрических изменений структурных компонентов иммунокомпетентных зон тимуса, селезенки и лимфатических узлов. Установлено, что в тимусе на 90 сутки инвазии площадь коркового вещества уменьшалась до 30,33 % (в 1,8 раза). Площади Т- и В-зависимых зон селезенки и лимфатического узла достоверно изменялись в сторону уменьшения на 30-е сутки эксперимента. На 90-е сутки установлено статистически достоверное увеличение площади коркового плато лимфатических узлов.

10. Установлено снижение количества клеток эритроидного роста в костном мозге овец и свиней в процессе созревания инвазионных цистицерков. Выявлены изменения в миелограмме на 30 сутки у овец, инвазированных цистицерками, которые характеризовались увеличением количества эозинофилов до $24,5 \pm 0,87$ %, что в 13,6 раза выше, чем контрольные значения.

11. Проведен сравнительный анализ диагностической эффективности ИФР и дот-ИФР при цистицеркозах овец и свиней. Показана их равноценная диагностическая эффективность. Установлено, что специфичность этих тестов составляет 88 % при 90%-й чувствительности.

12. Определена эффективность тест-системы на основе дот-ИФР для выявления копроантигенов тениид плотоядных. Установлено, что специфичность теста составляет 92,3 %, чувствительность – 87,2 %. При этом тении в кишечнике плотоядных выявляются за 30 дней до обнаружения яиц гельминтов или зрелых проглоттид в фекалиях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Получен патент на изобретение №2219551 “Способ получения диагностического антигена цестод”, 20.12.2003 г.

Методические рекомендации “Обнаружение копроантигенов тениид собак на основе Dot-ELISA”, одобрены Отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии 24.12.2002 г.

Изданы: Патогенез и иммунодиагностика гельминтозов: учебное пособие. – М.: МГУПБ, 2004 – 52 с.; Классические методы диагностики гельминтозов: методические рекомендации к проведению лабораторно-практических занятий со студентами ветеринарных факультетов и вузов. – М.: МГУПБ, 2004. – 60 с.

Материалы диссертации используются в учебном процессе при подготовке ветеринарных врачей и цикле лекций по курсу «Инвазионные и паразитарные болезни животных» в разделе «Общая паразитология».

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бессонов, А.С. Антигены метацестод *T.saginata* и *T.crassiceps* их использование для серологической диагностики (*C.bovis*) цистицеркоза крупного рогатого скота / А.С. Бессонов, И.Г. Гламаздин // Вестник РАСХН.– 1992. – С. 50-54.
2. Гламаздин, И.Г. Культивирование отдельных клеток гельминтов и получение диагностически ценных антигенов // Гигиена, ветсанэкспертиза и экология животноводства // Матер. Всерос. научн.-производств. конф. – Чебоксары, 1994. – С. 76 – 77.
3. Гламаздин, И.Г. Иммунодиагностика бовисного цистицеркоза / И.Г. Гламаздин, Н.Е. Косминков // Пища, экология, человек: Матер. научно-техн. конф. – М.: МГАПБ, 1995. –С. 53-54.
4. Косминков, Н.Е. Поиск альтернативных специфических иммуногенов в борьбе с некоторыми тканевыми гельминтозами : отчет по теме 7-3-91 Гос.рег. N 0191005593 / Н.Е. Косминков, И.Г. Гламаздин, Г.Л. Верховская и др. – М.: МГУПБ, 1996. –35 с.
5. Гламаздин, И.Г. Бычий цепень / И.Г. Гламаздин, Т.Н. Федосеева // Животноводство. – 1997. – № 12. – С. 30-32.
6. Гламаздин, И.Г. Диагностика бовисного цистицеркоза ELISA // Актуальные проблемы ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции : Матер. 2-й Междунар. науч.-практ. конф. Ч. 2. Актуальные проблемы ветеринарной медицины. – М.: МГУПБ, 1997. – С.127-128.
7. Гламаздин, И.Г. Сравнительная эффективность прижизненной диагностики стронгилятозов лошадей методами гельминто- и лярвоскопии и Dot-ELISA / И.Г. Гламаздин, Т.Н. Федосеева // Актуальные проблемы ветеринарно-санитарного контроля с.-х. продукции: Матер. 2-й Междунар. науч.-практ. конф. Ч. 2. Актуальные проблемы ветеринарной медицины. – М.: МГУПБ, 1997. – С. 151-152.
8. Гламаздин, И.Г. Иммунодиагностика бовисного цистицеркоза на основе ИФР в различных регионах / И.Г. Гламаздин, Н.Е. Косминков // Актуальные проблемы ветеринарно-санитарного контроля с.-х. продукции: Матер. 2-й Междунар. науч.-практ. конф. Ч. 2. Актуальные проблемы ветеринарной медицины. – М.: МГУПБ, 1997. - С. 155-156.
9. Гламаздин, И.Г. Культивирование отдельных клеток гельминтов и получение диагностически ценных антигенов // Актуальные проблемы ветсанконтроля с.-х. продукции : Матер. 2-й Междунар. науч.-практ. конф. – М., МГУПБ, 1997. – С.171-172.
10. Гламаздин, И.Г. Современные методы диагностики бовисного цистицеркоза // Тез. докл. юбил. конф. ГАВМ. – СПб.: ГАВМ, 1998. – С. 56-57.
11. Рысков, А.П. Получение новых молекулярно-генетических маркеров для идентификации паразитических червей нематод р. *Trichinella* / А.П. Рысков, Г.Г. Хрисанфова, С.К.Семенова, И.Г. Гламаздин О.Ф. Манойленко, А.В. Жилин // Молекулярная биология. – 1998. – Т.32. - № 6. – С. 123 -126.

12. Гламаздин, И.Г. Иммуноморфологические изменения при бовисном цистицеркозе / И.Г. Гламаздин, О.Ю. Федорина // Матер. 3-й Междунар. науч.-технич. конф. – М.: МГУПБ, 1999. – С. 103 – 104.
13. Гламаздин, И.Г. Получение клеточной культуры *T. canis* в среде Игла / И.Г. Гламаздин, С.В. Иванова // Сб. научн. тр. к 100-летию со дня рождения И.В. Орлова. – М.: МГУПБ, 1999. – С. 104-106.
14. Гламаздин, И.Г. Первичная клеточная культура *D. caninum* / И.Г. Гламаздин, О.В. Радина // Сб. научн. тр. к 100-летию со дня рождения И.В. Орлова. – М.: МГУПБ, 1999. – С. 107 – 108.
15. Гламаздин, И.Г. Выделение специфического антигена цестод / И.Г. Гламаздин, И.П. Головкина // Сб. научн. тр. к 100-летию со дня рождения И.В. Орлова. – М.: МГУПБ, 1999. – С. 59-60.
16. Гламаздин, И.Г. Диагностика специфических антител у собак, инвазированных *Toxocara canis*. / И.Г. Гламаздин, О.Ю. Федорина // 9-й Междунар. ветеринарный конгресс. – М., 2001. – С. 171-172.
17. Гламаздин, И.Г. Метод получения культуры клеток гельминтов Игла / И.Г. Гламаздин, С.В. Иванова // 9-й Междунар. ветеринарный конгресс. – М.: 2001. – С.103-104.
18. Гламаздин, И.Г. Изучение левамизола при вторичных иммунодефицитных состояниях / И.Г. Гламаздин, Э.А. Брагина // Сб. научн. тр. к 100-летию со дня рождения И.В. Орлова. – М.: МГУПБ, 1999. – С. 61-62.
19. Гламаздин, И.Г. Гельминтозы собак и профилактика осложнений *caninum* / И.Г. Гламаздин, О.А. Федорченко // 10-й Московский междунар. ветеринарный конгресс. – М., 2002. – С. 202-203.
20. Гламаздин, И.Г. Диагностика цестодозов плотоядных // 10-й Московский междунар. ветеринарный конгресс. – М., 2002. – С.198-199.
21. Гламаздин, И.Г. Дифференциальная диагностика метацестод овец иммуноферментной реакцией // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями (зоонозы). – М.: ВИГИС, 2002. – С. 143-144.
22. Гламаздин И.Г. Профилактика осложнений при дегельминтизации собак // Вестник ветеринарной медицины. - 3 (6) 2002. – С. 41-42.
23. Гламаздин, И.Г. Распространение цистицеркозов с.-х. животных на территории России // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции : Матер. 4-й Междунар. науч.-практ. конф. Т. I. – М.: МГУПБ, 2002. – С.183-184.
24. Гламаздин И.Г. Антителогенез при тканевых гельминтозах животных // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции : 4-я Междунар. науч.-практ. конф. Т. 1. – М.: МГУПБ, 2002. – С. 107-108.
25. Гламаздин, И.Г. Особенности иммунитета при гельминтозах // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции : 4-я Междунар. науч.-практ. конф. Т. 1. – М.: МГУПБ, 2002. – С. 121-122.
26. Гламаздин, И.Г. Иммунитет, иммунодиагностика и этиопатогенетическая терапия при гельминтозах животных : Отчет по Российской координаци-

онной НТП заданию 3. ВИГИС / И.Г. Гламаздин, Н.Ю. Сысоева, Г.Л. Верховская и др. М., 2003.

27. Гламаздин, И.Г. Эхинококкоз животных, новые пути контроля над распространением инвазии / И.Г. Гламаздин, И.Г. Серегин, И.А. Логинов // 4-я Междунар. науч.-практ. конф. Т II. – М.: МГУПБ, 2002. – С. 143-144.

28. Гламаздин И.Г. Иммунологическая и традиционная диагностика гельминтозных болезней собак / И.Г. Гламаздин, О.А. Федорченко // 11-й Московский междунар. ветеринарный конгресс, 17-19 апреля 2003 г. – М., 2003. – С. 78-79.

29. Косминков, Н.Е. Трихинеллез животных. Методы диагностики : учеб.-метод. пособие / Н.Е. Косминков, И.Г. Гламаздин, Н.Ю. Сысоева, Г.Л. Верховская. – М.: МГУПБ, 2002. – 64 с.

30. Гламаздин, И.Г. Иммуногенез при цистицеркозах, принципы иммунодиагностики // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – М.: ВИГИС, 2003. – С. 101-102.

31. Гламаздин, И.Г. Антигены гельминтов, механизм иммунитета хозяина / И.Г. Гламаздин, Е.А. Авдулова // Живые системы и биологическая безопасность населения: Матер. 2-й междунар. науч. конф. студентов и молодых ученых. – М.: МГУПБ, 2003. – С. 56-57.

32. Гламаздин, И.Г. Иммуноморфология при экспериментальном заражении тонкошейным финозом овец // Пища, экология, человек: Матер. 5-й междунар. науч.-технич. конф. – М.: МГУПБ, 2003. – С. 27-29.

33. Гламаздин, И.Г. Диагностическая эффективность dot-ELISA при спонтанных цестодозах собак // Ветеринария. – 2003. – №12. – С. 22-24.

34. Гламаздин, И.Г. Физико-химическая характеристика возбудителей цистицеркозов свиней и жвачных и морфометрические изменения иммунокомпетентных органов при экспериментальном заражении // Труды ВИГИС. – М., 2004. – Т.40. – С. 56-60.

35. Гламаздин, И.Г. Патогенез и иммунодиагностика гельминтозов : учеб. пособие. – М.: МГУПБ, 2004. – 52 с.

36. Гламаздин, И. Г. Метаболиты токсокар и возможность их использования в диагностике токсокароза собак / И.Г. Гламаздин, С.В. Петрушина // XII междунар. московский конгресс по болезням мелких домашних животных, 22 – 24 апреля 2004. – М., 2004. – С. 121-122.

37. Гламаздин, И.Г. Гуморальный иммунный ответ хозяина и диагностика гельминтозов / И.Г. Гламаздин, Е.А. Авдулова, О.А. Федорченко // XII междунар. московский конгресс по болезням мелких домашних животных 22 – 24 апреля 2004. – М., 2004. – С. 130-131.

38. Гламаздин, И.Г. Иммунологические изменения в системе “паразит-хозяин” при цестодозах // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: Сб. статей. – Вып. 5. – М.: ВИГИС, 2004. – С. 92-93.

39. Гламаздин, И.Г. Классические методы диагностики гельминтозов животных : учеб.-метод. пособие / И.Г. Гламаздин, Н.Ю. Сысоева, Г.Л. Верховская. – М.: МГУПБ, 2004. – 50 с.

40. Гламаздин, И.Г. Основные подходы к диагностике гельминтозов плотоядных / И.Г. Гламаздин, Н.Ю. Сысоева, Г.Л. Верховская // Матер. 5-й междунар. науч.-практ. конф. – М.: МГУПБ, 2004. – С. 53-54.

41. Гламаздин, И.Г. Адаптивно-приобретенное равновесие в системе “паразит-хозяин” при цестодозах // Матер. : 5-й междунар. науч.-практ. конф. – М.: МГУПБ. – 2004. – С. 61-62.

42. Гламаздин, И.Г. Диагностика цистицеркозов овец / И.Г. Гламаздин, Н.И. Римиханов // Овцы, козы и шерстяное дело. – 2004. – №4. - С. 52-57.

Отпечатано в ООО «Компания Спутник+»

ПД № 1-00007 от 25.09.2000 г.

Подписано в печать 04.05.05

Тираж 100 экз. Усл. п.л. 2,69

Печать авторефератов (095) 730-47-74, 778-45-60

5

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

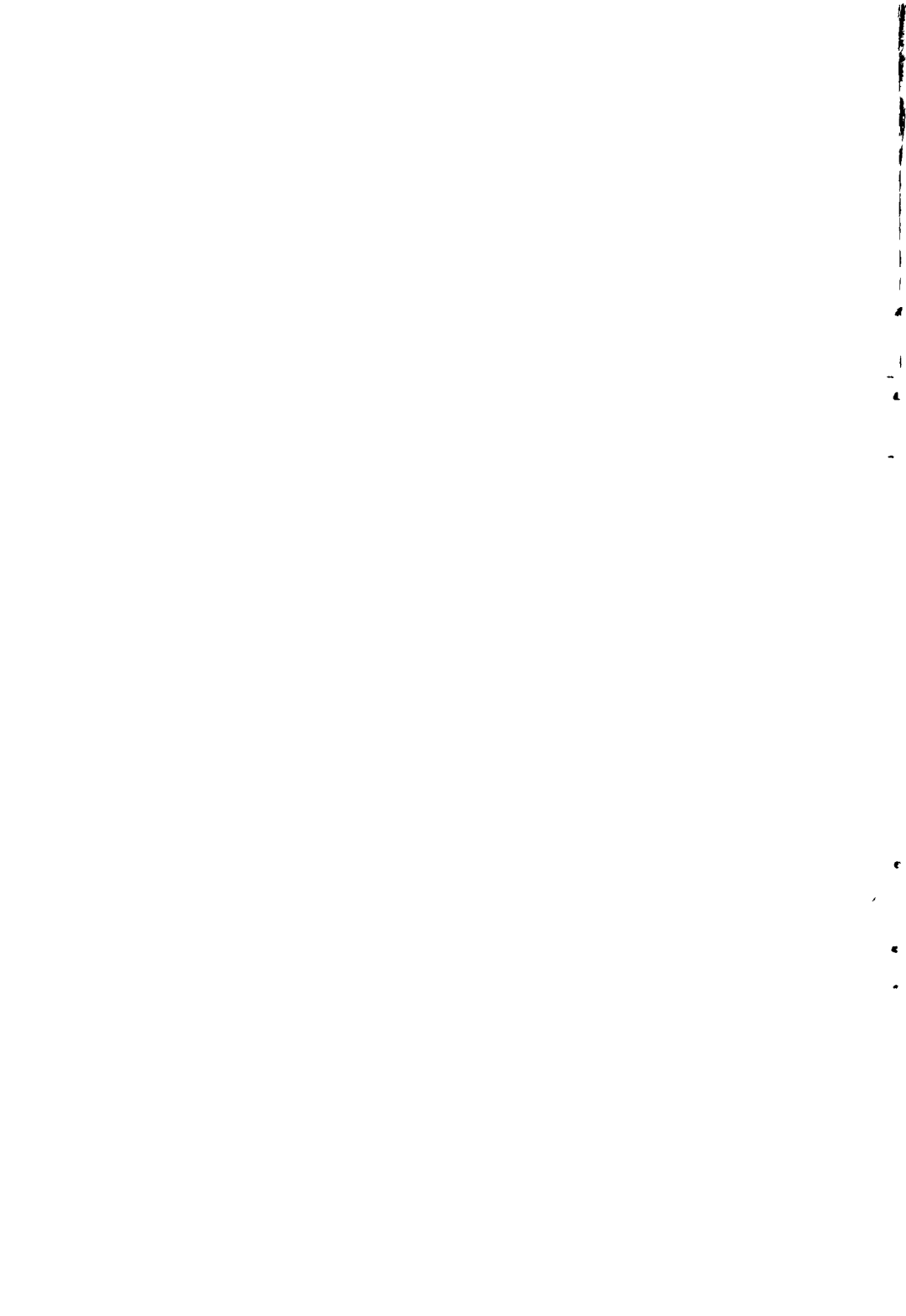
26

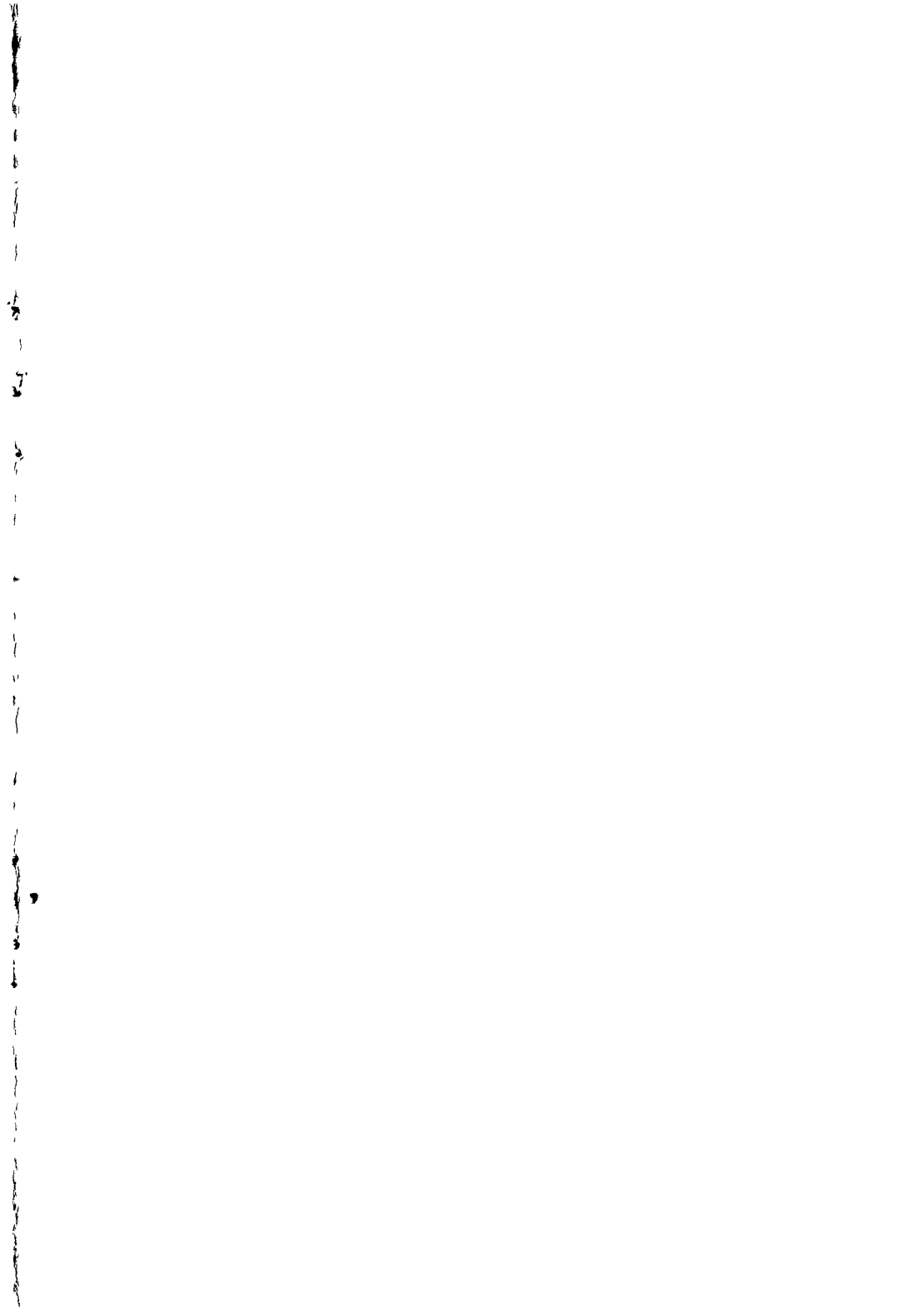
27

28

29

30





РНБ Русский фонд

2005-4

45792

07 МАЙ 2005

2005