

ГЛАВА 3.1.6.

ЭХИНОКОККОЗ (ИНФИЦИРОВАНИЕ ECHINOCOCCUS GRANULOSUS И E. MULTILOCULARIS)

РЕЗЮМЕ

Кистозный эхинококкоз у людей, вызываемый Echinococcus granulosus и альвеолярный эхинококкоз, вызываемый E. multilocularis, являются значительными угрозами для общественного здравоохранения во многих частях мира. Диагностика эхинококкоза у собак или других восприимчивых плотоядных зависит от обнаружения взрослых цестод рода эхинококков (Echinococcus) в их фекалиях или тонкой кишке. Копро-антиген и копро-ДНК анализы доказали свою эффективность для безопасной, быстрой и точной диагностики. У промежуточных хозяев диагностика обусловлена выявлением личиночной цисты при аутопсии, которая может инфицировать почти все органы, но особенно печень и легкие.

Идентификация агента: *в недавнем прошлом считалось, что существует пять видов рода Echinococcus. С современной точки зрения, на основании данных биологии, эпидемиологии и особенно молекулярного генотипирования, рекомендуется включить, как минимум 9 видов в данный род. Известно, что все эти виды Echinococcus вызывают кистозный эхинококкоз в промежуточном хозяине и могут именоваться E. granulosus sensu lato (s.l.), в то время как штаммы G1–G3 (которые являются близкородственными) на данный момент именуется E. granulosus sensu strictu (s.s.). Личиночные формы Echinococcus обычно можно визуально обнаружить в органах. При проведении специфической диагностики E. granulosus следует соблюдать особую осторожность в тех случаях, где у овец также присутствует Taenia hydatigena. Подтвердить поставленный диагноз можно посредством гистологического исследования, осуществляемого после окрашивания зафиксированного в формалине материала традиционными методами. Присутствие положительного в реакции Шифф-йодной кислотой бесклеточного слоистого пласта с или без внутренней клеточной ядродержащей герменативной оболочки можно рассматривать, как специфическую характерную черту плероцеркодиев эхинококков. Генотипирование с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) является единственным доступным методом для подтверждения видов Echinococcus, поражающих животных. Идентификация личиночной формы E. multilocularis у грызунов и других хозяев возможно посредством макроскопического или микроскопического исследования, а также путем обнаружения ДНК посредством ПЦР.*

Для обнаружения взрослых особей видов эхинококков у диких или домашних плотоядных при аутопсии требуется тонкая кишка. Работа с инфицированным материалом представляет риск для работника в плане заражения потенциально смертельной болезнью.

Копро-антиген или копро-ДНК анализы: *Наблюдается значительный прогресс в области разработки иммунологических тестов для диагностики кишечных эхинококковых инфекций посредством использования метода обнаружения копро-*

антигена. Данный метод с успехом использовался для обнаружения *E. granulosus* у собак и используется в настоящее время в обследованиях на наличие *E. multilocularis* в популяциях лисиц и собак. Обнаружение копро-антигена возможно в образцах фекалий, собранных от мертвых или живых животных или в окружающей среде. В настоящее время в специализированных лабораториях в качестве диагностических методов для обнаружения *E. multilocularis*, а в последнее время и *E. granulosus*, внедрены ПЦР/ДНК-методы.

Серологические тесты. В сыворотке от инфицированных собак и овец можно обнаружить антитела к антигенам онкосферы, эхинококковой жидкости и протосколекса, но в настоящее время данный подход имеет ограниченное практическое использование, поскольку он не дифференцирует текущие и предыдущие инфекции. Чувствительность в случае низкой паразитарной нагрузки также не высока. Может также иметь место перекрестная реактивность между видами *Echinococcus* и *Taenia*.

Требования к вакцинам. В области разработки вакцины (Eg95) против личиночной стадии *E. granulosus* у овец и КРС наблюдается значительный прогресс.

А. ВВЕДЕНИЕ

Виды рода *Echinococcus* представляют собой небольшие ленточные черви, поражающие плотоядных, имеющие ларвальные стадии (плероцеркоиды), известные как гитатиды, бесполо пролиферирующие в различных млекопитающих, включая человека. До недавнего времени существовало пять морфологически отличных вида этого рода *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthus*, *E. vogeli* и *E. shiquicus*. *Echinococcus granulosus* прежде считавшийся отдельным видом с высоким генотипным и фенотипным разнообразием, сейчас признается группой криптических видов, которые значительно отличаются в своей морфологии, развитии, специфичности к хозяину (включая инфективность или патогенность для людей). Это разнообразие отражается в митохондриальных и ядерных геномах. Основываясь на фенотипических характерах и последовательностях генов *E. granulosus* (sensu lato [s.l.]) был подразделен на *E. granulosus* (sensu stricto [s.s.]) (включая прежде идентифицированные генотипические варианты G1–3), *E. felidis* (в прошлом «львиный штамм»), *Echinococcus equinus* («лошадиный штамм», генотип G4), *E. ortleppi* («штамм КРС», генотип G5) и *E. canadensis*. Последний вид, как здесь признается, демонстрирует самое высокое разнообразие и включает «верблюжий штамм», генотип G6, «свиной штамм», генотип G7, и два «оленьих штамма», генотипы G8 и G10 (Nakao *et al.*, 2013; Romig *et al.*, 2015). *Echinococcus granulosus* (s.l.) распространен по всему миру, *E. multilocularis* встречается в обширных областях Северного полушария, *E. shiquicus* обнаруживается в Китайской Народной Республике, а распространение *E. oligarthrus* и *E. vogeli* ограничено Центральной и Южной Америки. Все пять изначально описанных видов инфекционны для людей и вызывают у них различные формы эхинококкоза, хотя в последней таксономической классификации существует доказательство инфицированием *E. equinus* у людей. Во многих частях мира значительную озабоченность с точки зрения здравоохранения вызывают такие формы эхинококкоза у людей, как кистозный эхинококкоз, вызываемый *E. granulosus*, и альвеолярный эхинококкоз, вызываемый *E. multilocularis* (ВОЗ/МЭБ, 2001).

Таблица 1. Полезные характеристики для идентификации видов *Echinococcus*. (Источник: Xiao *et al.* 2006)

	<i>E. granulosus</i>	<i>E. multilocularis</i>	<i>E. oligarthrus</i>	<i>E. vogeli</i>	<i>E. shiquicus</i>
Распространение	По всему миру	Голоарктический регион	Неотропический регион	Неотропический регион	Тибетское плато
Окончательный хозяин	Собаки	Лисы	Дикие кошки	Кустарниковая собака	Тибетская лиса
Промежуточный хозяин	Копытные	Мелкие грызуны	Неотропические грызуны	Неотропические грызуны	Пищуха
Взрослая особь:					
Длина тела (мм)	2,0 – 11,0	1,2 – 4,5	2,2 – 2,0	3,9 – 5,5	1,3 – 1,7
Кол-во сегментов	2 – 7	2 – 6	3	3	2 – 3
Длина больших крючьев (мкм)	25,0 – 49,0	24,9 – 34,0	43,0 – 60,0	49,0 – 57,0	20,0 – 23,0
Длина малых крючьев (мкм)	17,0 – 31,0	20,4 – 31,0	28,0 – 45,0	30,0 – 47,0	16,0 – 17,0
Кол-во семенников	25 – 80	16 – 35	15 – 46	50 – 67	12 – 20
Расположение полового отверстия					
а. Половозрелый сегмент	Ближе к середине	В передней половине	В передней половине	В задней половине	Ближе к верхнему краю
б. Сегмент, наполненный оплодотворёнными яйцами	В задней половине	В передней половине	Ближе к середине	В задней половине	В передней половине
Матка, наполненная яйцами	Разветвление сбоку	Мешко-подобная	Мешко-подобная	Полая	Мешко-подобная
Плероцеркоид	Однокамерные кисты во внутренних органах	Многокамерные кисты во внутренних органах	Многопузырьковые кисты в мышцах	Многопузырьковые кисты во внутренних органах	Однокамерные кисты во внутренних органах

1. *Echinococcus granulosus* (sensu lato)

Паразит передается среди видов домашних собак и некоторых видов домашних копытных. Наибольшую важность представляет цикл собака/овца (*E. granulosus*). Могут также встречаться лесные окончательные и промежуточные хозяева, например волк/олень (*E. canadensis*). Длина взрослых форм варьируется от 2 до 11 мм, они обычно имеют от двух до семи сегментов, в среднем от трех до четырех сегментов. Половозрелым является предпоследний сегмент, половое отверстие обычно открывается за средней частью сегмента, как в половозрелых сегментах, так и в сегментах наполненных яйцах. Последний сегмент (сегмент с яйцами) обычно составляет более половины длины всего червя. На протосколексе находятся хоботковые крючья различного размера, расположенные в два ряда. Размер крючьев в первом ряду варьируется от 25 до 49 мкм, а во втором ряду от 17 до 31 мкм. Матка со зрелыми яйцами имеет хорошо развитые мешотчатые образования.

Личиночная стадия представляет собой наполненный жидкостью пузырь или гидатидную кисту, которая имеет одну камеру, хотя также встречаются формы с сообщающимися камерами. Рост – обширный, может наблюдаться продуцирование эндогенных дочерних цист. Отдельные пузыри могут достигать до 30 см в диаметре и чаще всего встречаются в печени и легких, но могут образовываться и в других внутренних органах. Инфекцию на этой стадии называют кистозным эхинококкозом.

Криптические виды *E. granulosus* (s.l.) в домашних циклах включают цикл собака/овца в Средиземноморском регионе, в Южной Америке (Аргентина, Бразилия, Чили, Перу и Уругвай), в Африке (Эфиопия, Кения и Судан), на Среднем Востоке и Левантских регионах, России, Центральной Азии (Казахстан, Кыргызстан, Узбекистан), Монголии, Китайской Народной Республике и Океании и в Соединенном Королевстве; цикл собака/лошадь в Бельгии, Ирландии и Соединенном Королевстве; цикл собака/КРС в Бельгии, Германии, Южной Африке и Швейцарии; цикл собака/свинья в Польше и цикл собака или волк/северный олень в субарктических районах Норвегии, Финляндии и Аляски, цикл собака/верблюд на Ближнем Востоке, в Африке, Центральной Азии и в КНР.

2. *Echinococcus multilocularis*

Передача паразита наблюдается в основном среди диких окончательных хозяев (например, *Vulpes vulpes*, *V. corsac*, *Alopex lagopus*) и мелких полевых грызунов (полевки и лемминги). Длина взрослых особей варьируется от 1,2 до 4,5 мм, они обычно имеют от двух до шести сегментов, в среднем от четырех до пяти. Предпоследний сегмент – это обычно зрелый сегмент; и у сегмента в состоянии зрелости, и у сегмента с яйцами половое отверстие находится в первой половине сегмента. Матка со зрелыми яйцами напоминает мешок. На хоботке размер более крупных крючьев из первого ряда варьируется от 24,9 до 34,0 мкм, во внутреннем ряду располагаются более мелкие крючья размером от 20,4 до 31,0 мкм.

Плероцеркоид имеет многопузырьковую структуру, состоящую из конгломератов мелких пузырьков, диаметр которых обычно не превышает нескольких миллиметров. В отличие от *E. granulosus* личиночная масса часто содержит полутвердый, а не жидкий матрикс. Данный вид быстро размножается посредством экзогенного почкования, и это приводит к инфильтрации тканей. Заражение этой стадией часто называют альвеолярным эхинококкозом. Данные о существовании определенных штаммов или генотипов *E. multilocularis* отсутствуют, хотя были описаны региональные варианты в масштабе континента (ВОЗ/МЭБ 2001).

Этот зоонозный паразит в основном обнаруживается в северном полушарии, и его жизненный цикл в основном поддерживается в дикой природе (Kamiya *et al.*, 2007). Лесной цикл охватывает лисиц и множество видов диких грызунов. Койоты, енотовидные собаки, волки, дикие кошки, домашние собаки и кошки, однако, могут служить окончательными хозяевами, в то время как свиньи, лошади, приматы и люди могут быть инфицированы в качестве промежуточных хозяев (Kamiya *et al.*, 2007). Собаки также могут быть изредка инфицированы личиночными стадиями, вызывающими поражения во внутренних органах, даже одновременно с взрослыми стадиями, присутствующими в желудочно-кишечном тракте.

3. *Echinococcus oligarthrus*

Обычно, в качестве окончательных хозяев паразит использует неотропических диких кошек (например *Felis concolor*, *F. jaguarondi*), а в качестве промежуточных хозяев крупных грызунов (например, *Dasyprocta sp.*, *Cuniculus paca*). Длина взрослых форм варьируется от 2,2 до 2,9 мм, они обычно имеют три сегмента, предпоследний из которых является сегментом в состоянии зрелости. У сегментов в состоянии зрелости половое отверстие находится в первой половине сегмента, а у сегментов с яйцами – примерно в середине сегмента. Матка со зрелыми яйцами напоминает мешок.

Плероцеркоид – многопузырьковый, наполнен жидкостью, с тенденцией к отделению и многокамерности. Хоботковые крючья протосколекса имеют разную длину, от 25,9 до 37,9 мкм. Более подробное описание крючьев дано в следующем абзаце, где производится их сравнение с крючьями *E. vogeli*. Единственная циста может достигать около 5 см в диаметре. Предпочтительные места заселения – внутренние органы и мышцы. До настоящего времени зарегистрировано только три сообщения о заболевании людей. У собак паразиты, по-видимому, не достигают половой зрелости.

4. *Echinococcus vogeli*

Обычно паразит использует в качестве дикого окончательного хозяина кустарниковую собаку (*Speothrus venaticus*), хотя домашние собаки также восприимчивы, а в качестве промежуточных хозяев - крупных грызунов (например, *Cuniculus paca*). Длина взрослых форм варьируется от 3,9 до 5,5 мм, они обычно имеют три сегмента, предпоследний из которых является половозрелым сегментом. И у половозрелого сегмента, и у сегмента с яйцами половое отверстие расположено во второй половине сегмента. Матка со зрелыми яйцами не имеет боковых мешотчатых образований и характеризуется относительной вытянутостью и трубчатой формой, по сравнению с другими сегментами, которые напоминают мешки.

Плероцеркоид похож на плероцеркоид *E. oligarthrus*. По сообщениям эти два вида можно дифференцировать, сравнивая различия в размерах и пропорциях хоботковых крючьев на протосколексе. Длина крючьев *E. oligarthrus* варьируется от 25,9 до 37,9 мкм (в среднем – 33,4 мкм) и от 22,6 до 29,5 мкм (в среднем 25,45 мкм) для больших и малых крючьев соответственно. У *E. vogeli* длина крючьев варьируется от 19,1 до 43,9 мкм (в среднем 41,64 мкм) и от 30,4 до 36,5 мкм (в среднем 33,6 мкм) для больших и малых крючьев соответственно. Кроме того, ограничительный элемент на крючке у *E. oligarthrus* разделяет его в пропорции 50:50, а у *E. vogeli* – 30:70.

Echinococcus vogeli является зоонозным возбудителем, и сообщается примерно о 100 случаях заболевания у людей в Южной Америке. Инфекцию, вызываемую личиночной стадией этого вида, обычно называют поликистозный эхинококкоз.

5. *Echinococcus shiquicus*

Паразит был обнаружен у тибетской лисы (*Vulpes ferrilata*), служащей ему окончательным хозяином, и у черногубой пищухи (*Ochotona curzoniae*), служащей ему промежуточным хозяином. У большинства видов *Echinococcus* сегмент со зрелыми яйцами соединен с половозрелым сегментом, однако стробил, состоящий только из двух сегментов (сегмент с яйцами напрямую прикреплен к незрелому сегменту), уникален для этого вида (ВОЗ/МЭБ, 2011 г.). Взрослая стадия морфологически схожа с *E. multilocularis*, но отличается более мелкими крючьями, меньшим количеством сегментов и яиц в сегменте с яйцами. Его легко отличить от *E. granulosus* по более короткой длине, матке со зрелыми яйцами без ответвлений и расположению полового отверстия в первой половине сегмента со зрелыми яйцами. Взрослая особь имеет размер от 1,3 до 1,7 мм.

Плероцеркоид обнаруживается в печени, в основном представляет собой однокамерную миницисту, содержащую полностью сформированный зародышевый слой, однако олиговезикулярные формы также встречались. Паразит отличается от *E. granulosus* тем, что не имеет дочерних цист, появляющихся в оплодотворенной цисте (ВОЗ/МЭБ, 2011 г.).

Подробное описание эхинококкоза у людей и животных можно найти в Руководстве ВОЗ/МЭБ по эхинококкозу (ВОЗ/МЭБ, 2011 г.).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 2. Методы исследования, доступные для диагностики эхинококкоза и их назначение

Метод	Назначение (цисты плероцеркоидов в промежуточных хозяевах)					
	Благополучие популяции по инфекции	Индивидуальное благополучие животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегию искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя						
Идентификация паразита/ВСЭ	+	-	++	+++	+++	++
Выявление антигена	-	-	-	-	-	-
ПЦР	-	-	-	+++	++	-
Выявление иммунного ответа						
ИФА	-	-	-	-	+	+
Метод	Назначение (взрослые черви в окончательных хозяевах)					
	Благополучие популяции по инфекции	Индивидуальное благополучие животного от инфекции до перемещения	Вклад в стратегию искоренения	Подтверждение клинических случаев	Превалентность инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация возбудителя						
Выявление антигена	+	+++	+++	+++	+++	-
ПЦР	-	+	+++	+++	+++	-
Выявление иммунного ответа						
ИФА	-	-	-	-	+	-

Объяснение: +++ = рекомендуемый метод, валидированный для показанных целей; ++ = подходящий метод, но может потребоваться дополнительная валидация; + = может использоваться в некоторых ситуациях, но затраты, надежность или другие факторы значительно ограничивают его применение; - = не подходит для этих целей; н/д = не применимо; ПЦР = полимеразная цепная реакция; ИФА = иммуноферментный анализ.

1. Идентификация агента

У промежуточных хозяев диагностика обусловлена обнаружением личиночных форм цист, которые могут встречаться почти в любом органе, но особенно в печени и легких во время ветеринарно-санитарной экспертизы или аутопсии. Для диагностики эхинококкоза у собак или других плотоядных требуется обнаружение взрослых цестод видов *Echinococcus* в их фекалиях или в тонком кишечнике или тестирование на наличие специфических копро-антигенов или копроДНК.

Исследователи, осуществляющие данные процедуры, подвергаются риску заражения и заболевания тяжелой болезнью. Риск должен быть минимизирован с помощью соответствующих процедур биозащиты и биосдерживания, на основании анализа

биологического риска (см. Главу 1.1.4 *Биозащита и биобезопасность: Стандарт управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и виварии*). Инфекционный материал (яйца/взрослые особи) можно деконтаминировать посредством замораживания при -80°C (температура в толще) в течение 5 дней или нагреванием при 70°C в течение 12 часов. Следует надевать лицевые маски, одноразовые перчатки и фартук. Дезинфекция химическими препаратами ненадежна, хотя гипохлорит натрия (10%) может уничтожить часть яиц (Craig, 1997). Контаминированный материал необходимо уничтожать посредством инсинерации или автоклавирования.

1.1. Диагностика яиц *Echinococcus* в образцах окружающей среды

1.1.1. Образцы фекалий (Ito, 1980; Thienpont *et al.*, 1979)

Яйца *Echinococcus* идентичны яйцам цестод тениид. Поэтому невозможно провести видоспецифичную диагностику только с помощью микроскопии. Однако выделение яиц может способствовать более точной идентификации посредством молекулярных методов. Один из методов это метод концентрации, в котором используется насыщенный раствор для отделения яиц *Echinococcus* от фекалий. Образец фекалий 0,5-2 г смешивается с водой или 0,3% Твин 20 в 1% формалине (Nonaka *et al.*, 1998) в 10-15 мл пробирке и подвергается центрифугированию (1000 *g* в течение 10 минут) единожды или дважды до получения прозрачной надосадочной жидкости. Осадок смешивают либо с 33% сульфатом цинка (1,18 удельного веса) или раствором сахарозы (1,27 удельного веса) и подвергают центрифугированию при 1000 *g* в течение 5 – 10 минут. Пробирка наполняется доверху и на нее помещают покрывное стекло. Покрывное стекло исследуют под микроскопом через 2-16 часов.

1.1.2. Образцы почвы (Matsuo & Kamiya, 2005)

20 гр образец почвы помещают в 50-мл коническую пробирку, в которую добавляют 40 мл 0,05% Твин 80. Смесь тщательно перемешивают и пропускают через сито с 100 мкм ячейками. Суспензия подвергается центрифугированию при 1000 *g* в течение 5 минут, затем удаляют надосадочную жидкость. Дальнейшая процедура проводится в соответствии с описанием метода концентрации, применяемого для исследования образцов фекалий.

1.2. Диагностика личиночного эхинококкоза

1.2.1. Аутопсия

Если надзор за *E. granulosus* у домашних животных можно проводить на лицензированных бойнях, то контроль видов эхинококков в дикой природе должен осуществляться посредством обследований в поле. При проведении надзора за *E. granulosus* в промежуточных хозяевах очень важно, чтобы данные разделялись и сообщались в соответствии с возрастом убитых животных. Степень превалентности сильно зависит от возраста, и данные, получаемые с боен, которые убивают только молодых животных, значительно занижают цифры в действительности. Это происходит из-за того, что более старые животные могут быть сильно инфицированы, даже если животные поражены только небольшим количеством личинок.

1.1.2.1 Процедура исследования

Гидатидные личинки можно наблюдать во многих органах, но у крупных животных, таких как овцы и КРС, следует производить пальпацию или рассечение. Свиньи, КРС, овцы и козы могут быть инфицированы личинками *Taenia hydatigena*, и, когда они находятся в печени, иногда трудно дифференцировать эти два паразита. У диких животных, таких как жвачные и грызуны, при дифференциальной диагностике следует принимать во внимание несколько других личиночных цестод. См. Главу 2.9.5. Цистоцеркоз для получения данных по другим цестодам, обнаруживаемым при ВСЭ.

- i) Материал с подозрением на наличие паразитов следует удалить из органа, вырезав его скальпелем включив питающие ткани, и хранить в прохладном месте (Прим.: ткань гидатидной цисты у нетронутых цист будет оставаться жизнеспособной в течение более 24 часов после смерти даже при комнатной температуре. Однако жизнеспособность можно продлить хранением при 4°C до 72 часов. Если материал невозможно изучить за это время, его следует хранить либо в 10% формосолевом растворе для последующего исследования под микроскопом, либо в 90% этаноле для последующего ДНК анализа. В идеале проба материала от паразита должна быть законсервирована в обеих средах. Замороженные ткани паразита не будут жизнеспособными, но могут быть исследованы морфологически после оттаивания и подвергнуты ДНК анализам).
- ii) Для морфологического анализа содержимого цист, жидкость необходимо удалить и удерживать при помощи шприца. Материал внутри цисты затем необходимо промыть физиологическим раствором, а содержимое исследовать под микроскопом (x4 объектив) на наличие протосколексов. Если протосколексов нет, слоистый пласт с внутренней части полости цисты может выглядеть как желеобразная структура, которую легко отделить. Материал, зафиксированный в формалине, можно окрашивать традиционными гистологическими методами. Присутствие положительного в ШИК-реакции, бесклеточного слоистого пласта под слоем соединительной ткани с или без внутренней клеточной ядродержащей герменативной оболочки, можно рассматривать, как специфическую характерную черту плероцеркоидов видов *Echinococcus*.
- iii) Во всех случаях точная идентификация видов возможна только с помощью экстрагирования ДНК из материала, фиксированного в этаноле (Dinkel *et al.*, 1998) и последующего генотипирования в полимерзаноной цепной реакции (ПЦР). Специфичные праймеры для всех видов эхинококков и родственных тениид приведены Roelfsema *et al.* (2016).

1.3. Диагностика взрослых паразитов у плотоядных

1.3.1. Аутопсия

Аутопсию неизменно используют при исследовании эхинококкозов у диких животных, её использование полезно и в случаях гуманной отбраковки домашних собак. Следует подчеркнуть, что необходимо проводить выделение и идентификацию взрослых форм *Echinococcus*, поскольку в обычных условиях исследования фекалий яйца *Echinococcus* невозможно отличить от яиц видов *Taenia*. В настоящее время яйца *E. granulosus* и *E. multilocularis* можно идентифицировать и дифференцировать от яиц других тениид с помощью ПЦР.

Сразу же после смерти, насколько возможно быстро, удаляют тонкую кишку и завязывают её с обоих концов. Если материал не замораживают или не фиксируют в формалине (4-10%), его следует быстро исследовать, поскольку в течение 24 часов паразиты могут разложиться. Формалин яйца не убивает. Свежий кишечник разделяют на несколько сегментов и погружают в 0,9 % солевой раствор при 37°C для проведения исследования. С помощью ручной лупы можно увидеть червей, прикрепившихся к стенке кишечника, и посчитать их (для *E. granulosus* и *E. vogeli*). Для произведения точных подсчетов незафиксированный кишечник лучше всего поделить на четыре или шесть фрагментов, вскрыть их и погрузить в 0,9 % солевой раствор при 37°C на 30 минут для высвобождения паразитов. Содержимое смывают в другой контейнер для проведения тщательного исследования, стенки кишечника соскабливают шпателем. Весь материал кипятят и промывают фильтрованием через сито для удаления зернистого материала и для обеззараживания. Промытое содержимое кишечника и соскобленный материал помещают на черный лоток и, используя ручную лупу или стереоскопический микроскоп, подсчитывают количество червей. Обычно *Echinococcus granulosus* выявляют в первой трети тонкой кишки собак, а *E. multilocularis* в средней и задней части. Этот подход имеет чувствительность выше 95%, за исключением случаев низкой паразитарной нагрузки, когда могут возникнуть ложноотрицательные результаты.

Аутопсия считается наиболее надежной формой диагностики *E. multilocularis* в окончательных хозяевах. Это недорогой метод для определения превалентности в популяции, который также является лучшим способом определения паразитарной нагрузки. Туши или кишечник окончательных хозяев для исследования следует хранить в состоянии глубокой заморозки при -70°C - 80 °C в течение 3-7 дней до аутопсии с целью уничтожения всех яиц. Яйца *E. multilocularis* устойчивы к замораживанию до - 50 °C.

1.3.2. Метод осаждения и подсчета (SCT) (Eckert, 2003)

Этот метод может считаться «золотым стандартом» для оценки чувствительности и специфичности других методов, однако копро-ДНК (ПЦР) анализ имеет более высокую чувствительность, чем SCT.

- i) Тонкий кишечник надрезают продольно и нарезают на сегменты 20 см длиной или на 5 частей приблизительно той же длины. Эти части переносят в стеклянный флакон, содержащий 1 литр физиологического солевого раствора (0,9% NaCl).
- ii) Стеклянный флакон энергично встряхивают в течение нескольких секунд, затем удаляют части кишечника. Поверхностный слой слизистой выдавливают с помощью большого и указательного пальца для удаления прикрепившихся гельминтов.
- iii) Стеклянный флакон оставляют на 15 минут для выпадения осадка, затем удаляют надосадочную жидкость. Стеклянный флакон вновь заполняют физиологическим солевым раствором. Эту процедуру повторяют 2-6 раз до тех пор, пока надосадочная жидкость не будет свободна от окрашенных частиц.

- iv) Частицы осадка исследуют небольшими порциями, приблизительно 5-10 мл, в прямоугольной пластиковой чашке или чашке Петри с измерительной сеткой (9 x 9 см) под стереомикроскопом при увеличении x 120.
- v) Если обнаружено до 100 гельминтов, проверяют всю массу осадка, если присутствует большее количество гельминтов, то подсчитывается общая гельминтная нагрузка на основе одной подвыборки.

1.3.3. Метод соскабливания кишки (IST) (Deplazes & Eckert, 1996)

- i) С помощью предметных стекол (75 x 25 x 1 мм) следует сделать глубокие соскобы со слизистой на равных расстояниях от тонкой кишки. Рекомендуется брать по пять соскобов со слизистой из проксимальной, срединной и задней трети тонкой кишки (всего 15). Перенести приставший материал в квадратные пластиковые чашки Петри.
- ii) Материал соскоба расплющивают между стеклами и исследуют под стереоскопическим световым микроскопом (x 120). Три слайда помещают на одну пластиковую чашку и исследуют. *Echinococcus multilocularis* обычно выявляют во второй половине тонкой кишки.

1.3.4. Метод «встряхивания в сосуде» (SVT) (Duscher et al., 2005)

- i) Следует использовать пластиковый сосуд (1 литр) с пластиковой прикручивающейся крышкой, в центре которой находится отверстие 6-7 см в диаметре. Отверстие закрывают химически чистой стальной сеткой (размер сетки 500 мкм), прикрепляемой к пластиковому кольцу с помощью паяльника. Для герметизации краев стальной сетки применяют силикон.
- ii) Продольно разрезанную тонкую кишку переносят в сосуд со всем ее содержимым; сосуд закрывают крышкой и наполняют водой.
- iii) Сосуд переворачивают и встряхивают; воду удаляют. Сосуд вновь наполняют водой, процесс повторяют до тех пор, пока вода не станет чистой.
- iv) Наполовину заполненный сосуд открывают, а кишечник удаляют. Кишечник продавливают между указательным и большим пальцем для извлечения паразитов, прикрепившихся к слизистой.
- v) Сосуд снова закрывают, вновь наполняют и встряхивают последний раз, затем удаляют как можно больше воды.
- vi) Оставшийся осадок выливают в 1-литровый пластиковый кувшин и хранят при 4 °С. Для более длительного хранения 0,9% раствор NaCl добавляют в осадок, чтобы паразиты не съезжались.
- vii) Для анализа материалы помещают в небольшие чашки Петри и сканируют вдоль выгравированных линий с помощью стереомикроскопа, как описано выше.

1.3.5. Консервация образцов

Целые черви очень хрупкие, поэтому для морфологических исследований лучше всего проводить манипуляции в нормальном физиологическом растворе, используя пипетку Пастера. Червей отмывают от остального материала и оставляют приблизительно на 30 минут до прекращения всех движений. После удаления жидкости добавляют холодный 5-10% формалин (5°C) или FAA фиксатор (95% этанол [80 мл], 37-40% формальдегид [10 мл] и ледяную уксусную кислоту [5 мл]), червей оставляют еще на 12 часов. Для окрашивания червей промывают в воде в течение 15 минут и помещают в паракармин Майера (карминовая кислота [1.0 г], хлористый алюминий [0,5 г], хлорид кальция [4,0 г] и 70% этанол [100 мл]) на 12-24 часа. Излишки красителя удаляют посредством погружения в 0,5-1,0% раствор соляной кислоты на несколько секунд. Дегидратацию осуществляют посредством серийного переноса в восходящие концентрации спирта (41, 50, 70, 85, 95 и 100%), выдерживая, как минимум, 15 минут в каждой концентрации, с двумя сменами при 100% концентрации. Спирт удаляют с помощью ксилола (10 минут) и осветляют с помощью метилсалицилата или креозота. До помещения препарата в любую подходящую среду, такую как бальзам, пиколит и т.д., образцы следует на несколько минут вернуть в ксилол. Лица, осуществляющие такие исследования, должны как минимум один раз в год проходить серологическое обследование на наличие сывороточных антител к эхинококкам (ВОЗ/МЭБ, 2001).

За последние 15 лет разработано несколько методов для упрощения и усовершенствования эпидемиологических исследований в популяциях окончательных хозяев или для проведения диагностики у живых животных. Данные методы включают обнаружение копро-антигенов и обнаружение ДНК методом ПЦР (см. ниже).

1.4. Обследование и надзор с применением ареколина

Ареколин применялся для проведения обследований популяций собак на заражение ленточными червями. В настоящее время вместо ареколина в качестве контрольного агента используют празиквантел.

2. Копрологические исследования

Взрослые черви *Echinococcus*, населяющие кишечник, будут выделять как поверхностные или секреторные молекулы (антигены), так и ДНК (обычно содержащуюся в яйцах). Оба типа молекул могут быть выявлены посредством исследования проб фекалий. На чувствительность тестов серьезно влияет степень паразитарной нагрузки и стадия зрелости.

2.1. Тестирование на наличие копро-антигена

Специфичный и чувствительный лабораторный анализ для выявления антигена в образцах фекалий собачьих (копро-антиген) способен заменить исследование с использованием ареколина, и является предпочтительным при проведении серологии для выявления текущей инфекции (Allan *et al.*, 1992; Deplazes *et al.*, 1992). ИФА (иммуоферментный анализ) на копро-антиген или копроИФА представляет собой альтернативный метод диагностики эхинококкоза у собак в котором используются как поликлональные, так и моноклональные антитела: направленные как на соматические, так и на секреторные/секреторные антигены. Для создания поликлональных антител к *Echinococcus* spp. Кролики были гипериммунизированы антигенами *Echinococcus*, такими как секреторные/секреторные экстракты взрослых особей или простолексов, или соматические экстракты взрослых ленточных червей. Альтернативным образом

моноклональные антитела были продуцированы посредством мышей доноров, гипериммунизированных соматическими или экскреторными/секреторными антигенами *E. granulosus* (Craig et al., 2015). КопроИФА обычно являются родоспецифичными к *Echinococcus* spp. (Allan & Craig, 2006), хотя в зависимости от эндемичного региона и целей исследования были разработаны и валидированы копроИФА для исследования на наличие инфекции *E. multilocularis* у лисиц и собак, или непосредственно *E. granulosus*. В отношении эхинококкоза собак, вызываемого *E. granulosus*, большинство авторов сообщают об относительной специфичности (78 – 100%) и хорошей родовой специфичности от 85% и выше чем 95%, а также о некоторой степени выявления в период инкубации (Craig et al., 2015). Если возникают перекрестные реакции, то они обычно являются результатом инфекции *Taenia hydatigena*, самыми распространенными тениидами собак, и попытки повысить специфичность посредством использования моноклональных антител копроИФА не увенчались успехом. Чувствительность копроИФА широко коррелирует с паразитарной нагрузкой *E. granulosus*, однако некоторые низко интенсивные инфекции (паразитарная нагрузка <50- 100) может стать причиной ложноотрицательных результатов в копроИФА (Allan & Craig, 2006). Копро-антигены можно обнаружить до высвобождения яиц эхинококковыми червями, и поэтому они не связаны с антигенами яиц. Это является плюсом при выявлении инкубационной инфекции. Более того уровни копро-антигена возвращаются до доинфекционного уровня в течение 5 дней противопаразитарного лечения инфицированных собак (Deplazes et al., 1992). Еще более важно то, что это сокращает биологический риск подвергания персонала воздействию потенциально инфективных яиц во время очистки кишечника или аутопсии.

Аутопсия для обнаружения заражения *E. multilocularis* у лисиц требует много времени. Тестирование на наличие копро-антигена посредством ИФА предлагает специфическую практическую альтернативу. Образцы фекалий у лисиц следует отбирать при патологоанатомическом исследовании, лучше из прямой кишки, а не из тонкой кишки. Копро-антигены эхинококков также остаются стабильными в фекалиях собак и лисиц, оставленных при температуре 20°C на одну неделю и в замороженных фекалиях собак. Метод тестирования на наличие копро-антигена также успешно применялся для оценки эффективности удаления гельминтов у диких лисиц, инфицированных *E. multilocularis*, с помощью приманок с добавлением празиквантела, которые доказали свою эффективность при уничтожении источника инфекции.

2.1.1. Процедура теста на наличие копроантигена (*Echinococcus granulosus*) (Allan et al., 1992; Craig et al., 1995)

- i) Образец фекалий (собранных через прямую кишку или с земли) смешивают с равным объемом забуференного фосфатом солевого раствора (ЗФР), pH 7,2, содержащем 0,3% Твин 20 (ЗФР-Т) в 5 мл одноразовой пробирке с колпачком. Пробирку энергично встряхивают и центрифугируют при 2000 g в течение 20 минут при комнатной температуре. Фекальные надосадочные жидкости можно исследовать немедленно или хранить при -20°C и более низких температурах. Так же пригодны для использования вязкие или очень темного цвета надосадочные жидкости.
- ii) 96-луночный титрационный микропланшет для ИФА покрывают оптимальной концентрацией (обычно 5 мкг на мл) очищенной от белка А IgG фракцией кроличьего против-*E. granulosus* проглотидного экстракта (Allan et al., 1992) в 0,05 М бикарбонатном/карбонатном буфере, pH 9,6 (100 мкл на одну лунку). Планшет накрывают и инкубируют в течение ночи при 4°C.

- iii) Лунки промывают три раза в ЗФР-Т с интервалом между промываниями в одну минуту; затем в каждую лунку добавляют 100 мкл того же буфера и планшет инкубируют в течение одного часа при комнатной температуре.
- iv) ЗФР-Т удаляют и добавляют по 50 мкл исходной фетальной телячьей сыворотки во все лунки. Затем добавляют по 50 мкл надосадочной жидкости образцов фекалий (в двух повторностях). Планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа, накрыв и запечатав его клейкой пленкой.
- v) Лунки промывают как в этапе iii), но содержимое выливают в 10% раствор хлорной извести (гипохлорит).
- vi) Готовят оптимальное разведение конъюгата IgG кроличьего анти-*E. granulosus* проглотидного экстракта и пероксидазы (Allan *et al.*, 1992) в ЗФР-Т и добавляют его во все лунки, по 100 мкл на лунку. Планшеты инкубируют в течение одного часа при комнатной температуре (22-24 °C).
- vii) Лунки промывают как в этапе iii).
- viii) Затем в лунки добавляют тетраметил бензидиновый субстрат (ТМБ, KPL Labs), по 100 мкл в одну лунку, планшет оставляют в темноте на 20 минут при комнатной температуре (22-24 °C).
- ix) Считывание показателей абсорбции лунок производят при 630 нм. Остановку реакции фермент-субстрат производят путем добавления 100 мкл 1 М фосфорной кислоты (H₃PO₄) в каждую лунку. В случае положительного результата, окраска изменяется с синей на желтую, и считывается при 450 нм.
- x) Лаборатории должны устанавливать свои собственные конечные критерии, используя положительные и отрицательные образцы. Стандарты можно также получить из Справочных лабораторий МЭБ (смотри таблицу, представленную в Части 4 данного *Руководства по наземным животным*). Обычно в качестве порогового значения при переходе от положительного значения к отрицательному берется 3 стандартных отклонения выше среднего показателя адсорбции для контрольных отрицательных образцов или по отношению к справочному стандартному контрольному положительному образцу, используя эквивалентность единиц адсорбции.

2.1.2. Процедура теста на наличие копроантигена (*Echinococcus multilocularis*) (Morishima *et al.*, 1999; Nonaka *et al.*, 1998)

Сэндвич-ИФА с использованием моноклональных антител EmA9, выращенных против соматического антигена взрослых особей *E. multilocularis*.

- i) 0,5 г каждой пробы фекалий помещают в пробирку для центрифугирования, а 1% раствор формалина, содержащий 0,3% Твин 20, добавляют к общему объему 15 мл.
- ii) После тщательного перемешивания раствор фекалий подвергают центрифугированию при 1200 g в течение 10 минут при комнатной температуре. Часть надосадочной жидкости используется для анализа по выявлению копроантигена.

- iii) В плоскодонные титровальные микропланшеты наносят 50 мкл/лунка 1 мкг/мл кроличьего иммуноглобулина к экскреторным/секреторным продуктам зрелых *E. multilocularis* в 0,05 М NaHCO₃/Na₂CO₃ буфера (pH 9,6) и оставляют на ночь при 4 °С.
- iv) Планшеты моют три раза с ЗФР 250 мкл/лунка (pH 7,4), содержащим 0,05% Твин 20 (ЗФР-Т) и блокируют с помощью 100 мкл/лунка 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ЗФР в течение 1 часа при комнатной температуре (22-24 °С).
- v) Планшеты моют три раза (жидкостью, дезинфицированной 10% хлорной известью) и 50 мкл фекальной надосадочной жидкости добавляют в каждую лунку и планшеты инкубируют в течение 2 часов.
- vi) Планшеты снова моют четыре раза и 0,5 мкг/мл биотинилированного моноклонального антитела в 0,5% БСА/0,5% казеине в ЗФР-Т добавляют в каждую лунку, и планшеты инкубируют в течение одного часа.
- vii) Планшеты моют четыре раза и комплекс стрептавидин-биотинилированная пероксидаза хрена (Amersham Life Science), разбавленный 1/1000 в 0,5% БСА/0,5% казеине в ЗФР-Т, добавляют в каждую лунку, затем планшеты инкубируют в течение одного часа.
- viii) Планшеты моют пять раз и добавляют 100 мкл/лунка раствора субстрата (1 мг тетраметил бензидена в 10 мл 0,05 М цитратно-фосфатного буфера с 2 мкл H₂O₂).
- ix) Планшеты сразу же встряхивают и помещают в инкубатор при 37 °С в течение 30 минут. Реакцию останавливают добавлением 50 мкл/лунка 4 N H₂SO₄. Оптические плотности (ОП) планшетов считывают при 450 нм.
- x) Пороговая величина подсчитывается как средняя величина ОП плюс 3 стандартных отклонения проб от неинфицированных животных.

2.2. Копро-ДНК методы

2.2.1. Окончательные хозяева

Копро-ДНК доказала свою эффективность в диагностике эхинококкоза у животных - окончательных хозяев, а также в идентификации отдельных видов паразитов. Однако выделение ДНК из фекалий является трудоемкой процедурой.

ПЦР технически сложный и дорогой метод. В настоящее время он используется в основном для подтверждающего тестирования положительных проб на копро-антиген или для идентификации яиц тениидов, выделенных из фекалий. Таблица 3 демонстрирует различные праймеры, используемые для идентификации копро-ДНК из фекалий окончательных хозяев рода *Echinococcus*.

Таблица 2. ПЦР праймеры, используемые для выявления копро-ДНК (модифицированный вариант Mathis & Deplazes, 2006)

Назначение праймера: последовательности праймера (5'-3')	Публикация	Цель, комментарии
<i>E. multilocularis</i> GTG-AGG-CGA-TGT-GTG-ATG-GAG-AGA-AGG CAA-GTG-GTC-AGG-GGC-AGT-AG	Bretagne et al., 1993	Ген U1 sРНК: можно получить неспецифические продукты при использовании материала плероцеркоида содержащего хозяйскую ДНК (неопубликованные наблюдения) Митохондриальный 12S РНК ген; используется в гнездовой ПЦР в двух пробирках
Внешние праймеры: (P60 прямой) TTA-AGA-TAT-ATG-TGG-TAC-AGG-ATT-AGA-TAC-CC (P375 обратный) AAC-CGA-GGG-TGA-CGG-GCG-GTG-TGT-ACC Внутренние праймеры: (Pnest прямой) ACA-ATA-CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC (Pnest обратный) ATA-TTT-TGT-AAG-GTT-GTT-CTA	Dinkel et al., 1998	Митохондриальный 12S РНК ген; модифицированный вариант номера 14 для использования в гнездовой ПЦР в одной пробирке
Внешние праймеры: (Em-1) TAA-GAT-ATA-TGT-GGT-ACA-GGA-TTA-GAT-ACC-C (Em-2) GGT-GAC-GGG-CGG-TGT-TGT-A Внутренние праймеры: (Em-3) ATA-TTA-CAA-CAA-TAT-TCC-TAT-C (Em-4) ATA-TTT-TGT-AAG-GTT-GTT-CTA	Van der Giessen et al., 1999	Митохондриальный 12S РНК ген; модифицированный вариант от Dinkel et al., 1998, для использования в гнездовой ПЦР в одной пробирке
(EM-H15) CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC (EM-H17) GTG-AGT-GAT-TCT-TGT-TAG-GGG-AAG	Stieger et al., 2002	Субъединица 1 NADH дегидрогеназы (ND1) мтДНК; расщепление энзимом <i>CfoI</i> позволяет различать <i>E. multilocularis</i> и <i>E. granulosus</i>
<i>E. multilocularis</i> и <i>E. granulosus</i> ND1 (NDfor2-) AGT-TTC-GTA-AGG-GTC-CTA-ATA (NDrev2-) CCC-ACT-AAC-TAA-CTC-CCT-TTC	Moks et al., 2005	Повторяемые последовательности <i>E. granulosus</i> «овечий штамм»; приобретает ленточный паттерн при электрофорезе Митохондриальный 12S РНК ген; специфичный для <i>E. granulosus</i> «овечьего штамма» Аmplифицировать фрагмент <i>coxI</i> , генспецифичный для <i>E. granulosus</i>
<i>E. granulosus</i> (Eg1121a) GAA-TGC-AAG-CAG-CAG-ATG (Eg1122a)	Abbasi et al., 2003	

GAG-ATG-AGT-GAG-AAG-GAG-TG		
(Eg1f) CATTAATGTATTTTGTAAAGTTG (Eg1r) CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-TAA-CAC-C	Stefanic et al., 2004	
(EgO/DNA-IM1) прямой TCA-TAT-TTG-TTT-GAG-KAT-YAG-TKC обратный GTA-AAT-AAM-ACT-ATA-AAA-GAA-AYM- AC	Naidich et al., 2006	
<i>E. multilocularis</i> , <i>E. granulosus</i> and <i>Taeniid spp.</i> (JB11) AGA-TTC-GTA-AGG-GGC-CTA-ATA (JB12) AC-CAC-TAA-CTA-ATT-CAC-TTT-C (60.для мод.) ATG-TGG-TAC-AGG-ATT-AGA-TAC-CC (375. пересм. – мод.) GGT-GAC-GGG-CGG-TGT-GTA-CC	Trachsel et al., 2007	Цестоды Цестоды
(Eg1f) CAT-TAA-TGT-ATT-TTG-TAA-AGT-TG (Eg1r) CAC-ATC-ATC-TTA-CAA-TAA-CAC-C	Trachsel et al., 2007	<i>Echinococcus granulosus</i> (овечий штамм)
(EM-H15) CCA-TAT-TAC-AAC-AAT-ATT-CCT-ATC (EM-H17) GTG-AGT-GAT-TCT-TGT-TAG-GGG-AAG	Trachsel et al., 2007	<i>E. multilocularis</i>
(Cest1) TGC-TGA-TTT-GTT-AAA-GTT-AGT-GAT-C (Cest2) CAT-AAA-TCA-ATG-GAA-ACA-ACA-ACA-AG	Trachsel et al., 2007	<i>E. multilocularis</i>
(Cest4) GTT-TTT-GTG-TGT-TAC-ATT-AAT-AAG- GGT-G	Trachsel et al., 2007	<i>E. granulosus</i>
(Cest5) GCG-GTG-TGT-ACM-TGA-GCT-AAA-C	Trachsel et al., 2007	<i>Taenia spp.</i>
(Cest3) YGA-YTC-TTT-TTA-GGG-GAA-GGT-GTG (Cest5) GCG-GTG-TGT-ACM-TGA-GCT-AAA-C (Cest5seq) GAT-TCT-TTT-TAG-GGG-AAG-G	Trachsel et al., 2007	<i>Taenia spp.</i> (Праймер секвенирования для ампликона в 267 п.н. мультиплексной ПЦР)

Дифференциальную диагностику инфекций *E. granulosus* и *E. multilocularis* у окончательных хозяев можно производить посредством специфического обнаружения ПЦР-амплифицированной ДНК из яиц *E. multilocularis*, присутствующих в фекалиях. На практике, рекомендуется проводить обследование окончательных хозяев (например, лисиц), используя тест на обнаружение копро-антигена, и подтверждать полученные результаты с помощью ДНК-ПЦР. В Европе передача *E. multilocularis* обычно имеет место в тех районах, где *E. granulosus* неэндемичны или появляются очень редко. В других районах, включая части Ближнего Востока (Турция и Иран), Северной Африки (Тунис и

Марокко), Центральную Азию, Россию и Китайскую Народную Республику, эти два вида могут встречаться вместе (Craig et al., 1996). Для изучения перемежающегося выделения в среду и продолжительности выделения в среду ДНК паразитов необходимо дальнейшее исследование инфекции *E. multilocularis*.

Так как ПЦР обычно используется в качестве подтверждающего теста, предлагается концентрировать яйца гельминтов с помощью метода последовательного просеивания и промежуточной концентрации. Выделение ДНК из этих яиц можно проводить с помощью упрощенного протокола метода щелочного лизиса наряду с использованием коммерческого набора без органосольventных экстрактов (Lightowlers & Gottstein, 1995). Чувствительность выделения яиц с последующей ПЦР составляет 78% для *E. granulosus* и 50% для инфекции *E. multilocularis* у собак (Ziadinov et al., 2008).

2.2.2. Промежуточные хозяева.

Молекулярные методы важны для идентификации *Echinococcus* spp. в пробах, отобранных от скота на бойнях в эпидемиологических целях (Roelfsema et al., 2016). Для идентификации небольших или подвергшихся кальцинозу поражений, вызванных *E. multilocularis*, у промежуточных или aberrантных хозяев большую значимость представляет ПЦР (Conraths & Deplazes, 2015).

3. Серологические тесты

3.1. Промежуточные хозяева

Серологическая диагностика эхинококкоза у овец долгое время считалась потенциально важным инструментом в эпидемиологических исследованиях в эндемичных областях, а также для надзора при выполнении программ контроля гидатид. В течение многих лет было известно, что овцы, экспериментально инфицированные *E. granulosus*, могут значительно повышать специфичные IgG ответы в течение нескольких недель. Однако уровни сывороточных антител значительно варьировали при естественных инфекциях, приводя к ограниченной чувствительности и перекрестным реакциям с животными, инфицированными *Taenia hydatigena* или *T. ovis*. В настоящее время этот подход не может заменить аутопсию (Craig et al., 2015; McManus, 2014).

3.2. Окончательные хозяева

Серодиагностические исследования эхинококкоза собак считались потенциально пригодными для практических исследований собак на инфекцию *E. granulosus* и, изначально, как потенциальная замена очищения с помощью ареколина. Диагностическая специфичность была высокой (>90%), но чувствительность была в целом плохой (35 – 40%) при естественных инфекциях, и была значительно ниже при сравнении непосредственно с копро-антигеновым выявлением. Дальнейшие исследования по оценке существующих антигенов или получение рекомбинантных антигенов более хорошего качества могут повысить чувствительность серологических исследований на эхинококкоз собак.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Промежуточные хозяева

Применение эффективной вакцины для сокращения инфекции гидатидами у скота скорее всего будет иметь значительное влияние на уровень передачи болезни людям (Lightowlers,

2006)). Так как *E. granulosus* принадлежит семейству Taeniid, многие аспекты его иммунологического родства с промежуточным хозяином схожи с возникающими у видов *Taenia*. Более того, считается, что подход к разработке вакцины, применяемый в отношении видов *Taenia*, такой как нативные хозяйские защитные антигены *T. ovis*, также будут успешны в отношении *E. granulosus*. Поэтому в 1996 году была разработана рекомбинантная антигенная вакцина EG95 на основе белка онкосферы *E. granulosus*, экспрессированного в *Escherichia coli*. Вакцина доказала, что может оказывать сильное защитное действие (96–100%) против экспериментального контрольного заражения *E. granulosus* у овец. Затем вакцина успешно применялась в экспериментальных опытах в различных странах на овцах и других промежуточных хозяевах. Вакцина EG95 получила лицензию в нескольких странах (Lightowlers, 2006).

2. Окончательные хозяева

Разработка вакцин против *E. Granulosus* для собак должна в идеале сократить плодовитость и популяции червя, а также станет важнейшим шагом на пути к сокращению (профилактике) инфекционной нагрузки на промежуточных хозяев, тем самым сокращая (предотвращая) инфекцию собак. Однако до настоящего момента явных кандидатных молекул идентифицировано не было.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ABBASI I., BRANZBURG A., CAMPOS-PONCE M., ABDEL HAFEZ S.K., RAOUL F., CRAIG P.S. & HAMBURGER J. (2003). Copro-diagnosis of Echinococcus granulosus infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. Am. J. Trop. Med. Hyg., 69, 324–330.
2. ALLAN J.C. & CRAIG P.S. (2006). Coproantigens in taeniasis and echinococcosis. Parasitol. Int., 55, S75–S80.
3. ALLAN J.C., CRAIG P.S., GARCIA NOVAL J., MENCOS F., LIU D., WANG Y., WEN H., ZHOU P., STRINGER R., ROGAN M.T. & ZEYHLE E. (1992). Coproantigen detection for the immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans. Parasitology, 104, 347–355.
4. BRETAGNE S., GUILLOUN J.P., MORAND M. & HOUIN R. (1993). Detection of Echinococcus multilocularis DNA in fox faeces using DNA hybridization. Parasitology, 106, 193–199.
5. CONRATHS F.J. & DEPLAZES P. (2015). Echinococcus multilocularis: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. Vet. Parasitol., 213, 149–161.
6. CRAIG P.S. (1997). Immunodiagnosis of Echinococcus granulosus and a comparison of techniques for diagnosis of canine echinococcosis. In: Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco, Andersen F.L., Ouhelli H. & Kachani M., eds. Brigham Young University Print Services, Provo, Utah, USA.
7. CRAIG P.S., GASSER R.B., PARADA L., CABRERA P., PARIETTI S., BORGUES C., ACUTTIS A., AGULLA J., SNOWDEN R. & PAOLILLO E. (1995). Diagnosis of canine echinococcosis: comparison of coproantigen and serum antibody tests with arecoline purgation in Uruguay. Vet. Parasitol., 56, 293–301.
8. CRAIG P.S., ROGAN M.T. & ALLAN J.C. (1996). Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. Adv. Parasitol. 38, 169–250.

9. CRAIG P.S., MASTIN A., VAN KESTERIN F. & BOUFANA, B (2015). *Echinococcus granulosus*: Epidemiology and state-of-the-art of diagnostics in animals. *Vet. Parasitol.*, 213, 132–148.
10. DEPLAZES P. & ECKERT J. (1996). Diagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection in final hosts. *Appl. Parasitol.*, 37, 245–252.
11. DEPLAZES P., GOTTSTEIN B., ECKERT J., JENKINS D.J., WALD D. & JIMENEZ-PALACIOS S. (1992). Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitol. Res.*, 78, 303–308.
12. DINKEL A., VON NICKISCH-ROSENEGK M., BILGER B., MERLI M., LUCIUS R. & ROMIG T. (1998). Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1871–1876.
13. DUSCHER G., PROSL H. & JOACHIM A. (2005). Scraping or shaking – a comparison of methods for the quantitative determination of *Echinococcus multilocularis* in fox intestines. *Parasitol. Res.*, 95, 40–42.
14. ECKERT J. (2003). Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Trop.*, 85, 157–163.
15. ITO S. (1980). Modified Wisconsin sugar centrifugal-floatation technique for nematode eggs in bovine faeces. *J. Jpn Vet. Med. Assoc.*, 33, 424–429.
16. KAMIYA M. (2007). Collaborative control initiatives targeting zoonotic agents of alveolar echinococcosis in the Northern Hemisphere. *J. Vet. Sci.*, 8, 313–321.
17. LIGHTOWLERS M.W. (2006). Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology*, 133, S27–42.
18. LIGHTOWLERS M.W. & GOTTSTEIN B. (1995). Echinococcosis/hydatidosis: Antigens, immunological and molecular diagnosis. In: *Echinococcus and Hydatid Disease*, Thompson R.C.A. & Lymbery A.J., eds. CAB International, Wallingford, UK, 355–410.
19. LIGHTOWLERS M.W., LAWRENCE S.B., GAUCI C.G., YOUNG J., RALSTON M.J., MAAS D. & HEATH D.D. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Int. J. Parasitol.*, 18, 457–462.
20. MATHIS A. & DEPLAZES P. (2006). Copro-DNA tests for diagnosis of animal taeniid cestodes. *Parasitol. Int.*, 55, S87–90.
21. MATSUO K. & KAMIYA H. (2005). Modified sugar centrifugal flotation technique for recovering *Echinococcus multilocularis* eggs from soil. *J. Parasitol.*, 91, 208–209.
22. MCMANUS D.P. (2014). Immunodiagnosis of sheep infections with *Echinococcus granulosus*: in 35 years where have we come? *Parasite Immunology*, 36, 125–130.
23. MOKS E., SAARMA U. & VALDMANN H. (2005). *Echinococcus multilocularis* in Estonia. *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 1973–1974.
24. MORISHIMA Y., TSUKADA H., NONAKA N., OKU Y. & KAMIYA M. (1999). Evaluation of coproantigen diagnosis for natural *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes. *Jpn J. Vet. Res.*, 46, 185–189.
25. NAIDICH A., MCMANUS D.P., CANOVA S.G., GUTIERREZ A.M., ZHANG W., GUARNERA E.A. & ROSENZVIT M.C. (2006). Patent and pre-patent detection of *Echinococcus granulosus* genotypes in the definitive host. *Mol. Cell. Probes*, 20, 5–10.
26. NAKAO M., LAVIKAINEN A., YANAGIDA T. & AKIRA I. (2013). Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.*, 43, 1017–1029.
27. NONAKA N., TSUKADA H., ABE N., OKU Y. & KAMIYA M. (1998). Monitoring of *Echinococcus multilocularis* infection in red foxes in Shiretoko, Japan, by coproantigen detection. *Parasitology*, 117 (Pt 2), 193–200.
28. ROELFSEMA J.H., NOZARI N., PINELLI E. & KORTBEEK L.M. (2016). Novel PCRs for differential diagnosis of cestodes. *Exp. Parasitol.*, 161, 20–26.

29. ROMIG T., EBI D. & WASSERMANN M. (2015). Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Vet. Parasitol.* 213, 76–84.
30. STEFANIC S., SHAIKENOV B.S., DEPLAZES P., DINKEL A., TORGERSON P.R. & MATHIS A. (2004). Polymerase chain reaction for detection of patent infections of *Echinococcus granulosus* ('sheep strain') in naturally infected dogs. *Parasitol. Res.*, 92, 347–351.
31. STIEGER C., HEGGLIN D., SCHWARZENBACH G., MATHIS A. & DEPLAZES P. (2002). Spatial and temporal aspects of urban transmission of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology*, 124 (Pt 6), 631–640.
32. THIENPONT D., ROCHETTE F. & VANPARIJS O.F.J. (1979). Diagnosing helminthiasis by coprological examination. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium.
33. TRACHSEL D., DEPLAZES P. & MATHIS A. (2007). Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA. *Parasitology*, 134, 911–920.
34. VAN DER GIESSEN J.W., ROMBOUT Y.B., FRANCHIMONT J.H., LIMPER L.P. & HOMAN W.L. (1999). Detection of *Echinococcus multilocularis* in foxes in The Netherlands. *Vet. Parasitol.*, 82, 49–57.
35. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, Eckert J., Gemmell, M.A., Meslin F.-X., Pawlowski Z.S., eds. OIE (World Organisation for Animal Health), Paris, France, 1–265.
36. XIAO N., QIU J., NAKAO M., LI T., YANG W., CHEN X., SCHANTZ P.M., CRAIG P.S. & ITO A. (2006). *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. *Parasitol. Int.*, 55, S233–236.
37. ZIADINOV I., MATHIS A., TRACHSEL D., RYSMUKHAMBETOVA A., ABDYJAPAROV T.A., KUTTUBAEV O.T., DEPLAZES P., TORGERSON P.R. (2008). Canine echinococcosis in Kyrgyzstan: Using prevalence data adjusted for measurement error to develop transmission dynamics models. *Int. J. Parasitol.*, 38, 1179–1190. *

* *

NB: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по эхинококкозу (см. Таблицу 4 этого *Руководства по наземным животным* или см. сайт МЭБ для получения самого последнего списка <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Свяжитесь со Справочными лабораториям МЭБ для получения дополнительной информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против эхинококкоза/гидатидоза.

NB: Впервые принято в 1989 г. как эхинококкоза/гидатидоза. Последние изменения приняты в 2017 г.