

УДК 619:616.995.1

<https://doi.org/10.31016/978-5-6046256-9-9.2022.23.387-391>

МЕТОД ХИМИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ В ИСКУССТВЕННОМ ЖЕЛУДОЧНОМ СОКЕ ЛАРВОЦИСТ *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННОЙ ЖИЗНЕСПОСОБНОЙ КУЛЬТУРЫ ПРОТОСКОЛЕКСОВ

Руднева О. В.¹,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
лаборатории эпизоотологии и санитарной паразитологии,
rudneva.olga79@gmail.com

Аннотация

Впервые в мире выделена чистая жизнеспособная культура протосколексов *E. multilocularis* путем переваривания ларвоцист паразита в искусственном желудочном соке. В статье описан уникальный биологический, биохимический метод получения культуры протосколексов *E. multilocularis*, очищенной от соединительной и других тканей ларвоцист паразита, включая мертвых/недоразвившихся протосколексов в процессе выделения. Методы, основанные на переваривании тканей в искусственном желудочном соке (ИЖС) хорошо рекомендовали себя, особенно при лабораторной диагностике трихинеллеза. Смешивали с ИЖС из расчета 1:10 (1 г фрагментов ларвоцист на 15 мл раствора) следующего состава: вода водопроводная – 1000 см³ (температура 41–42°C); кислота соляная концентрированная (удельная масса 1,2) – 10 см³; пепсин пищевой – 6,0 г; NaCl – 9,0 г. Разработанный способ гарантирует получение жизнеспособных протосколексов паразита. Жизнеспособность выделенных протосколексов оценивали путем микроскопии осадка при увеличении объектива 4×10 по их целостности, двигательной активности и наличию/отсутствию инородных примесей. Способ прост в исполнении, не требует дополнительного оборудования и больших материальных затрат, позволяет увеличить выход чистых жизнеспособных протосколексов *E. multilocularis* до 95–98%.

Ключевые слова: *Echinococcus multilocularis*, протосколексы, альвеококкоз, ларвоцисты

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. П. Коваленко Российской академии наук» (117218, Россия, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28)

**THE METHOD OF CHEMICAL FERMENTATION
IN ARTIFICIAL GASTROINTESTINAL JUICE
OF *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* LARVOCYST
AS A METHOD FOR OBTAINING A PURIFIED VIABLE
PROTOSCOLEX CULTURE**

Rudneva O. V.¹,

Candidate of Biological Sciences,

Senior Researcher of the Laboratory of Epizootology and Sanitary Parasitology,

rudneva.olga79@gmail.com

Abstract

For the first time in the world, a pure viable culture of *E. multilocularis* protoscolexes was isolated by digesting the parasite's larvocysts in artificial gastric juice. The article describes a unique biological, biochemical method for obtaining a culture of *E. multilocularis* protoscolexes purified from the connective and other tissues of the parasite larvocysts, including dead/immature protoscolexes during isolation. Methods based on the digestion of tissues in artificial gastric juice (IGF) have proven themselves well, especially in the laboratory diagnosis of trichinosis. Mixed with IGS at the rate of 1:10 (1 g of larvocyst fragments per 15 ml of solution) of the following composition: tap water – 1000 cm³ (temperature 41–42°C); concentrated hydrochloric acid (specific gravity 1.2) – 10 cm³; food pepsin – 6.0 g; NaCl – 9.0 g. The developed method guarantees the production of viable protoscolexes of the parasite. The viability of the isolated protoscolexes was assessed by sediment microscopy with a 4×10 lens magnification for their integrity, locomotor activity, and the presence/absence of foreign matter. The method is simple to perform, does not require additional equipment and high material costs, allows you to increase the yield of pure viable *E. multilocularis* protoscolexes up to 95–98%.

Keywords: *Echinococcus multilocularis*, protoscolexes, alveococcosis, larvocyst

Введение. Эхинококкоз (лат. Echinococcosis) – гельминтоз из группы цестодозов, характеризующийся образованием в печени, легких или других органах и тканях паразитарных кист, распространяющихся по организму путем метастазирования. Эпидемиологическая ситуация по эхинококкозам в РФ по данным Федеральной службы по надзору в сфере прав потребителей и благополучия человека остается сложной. За пятилетний период (2016–2020 гг.) зарегистрировано 245 случая

¹All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia)

альвеококкоза в 31 субъекте Российской Федерации (согласно Государственным докладам «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации» 2016–2020 гг.) и 12 летальных случаев среди людей от инвазии *E. multilocularis*. Увеличение числа случаев заболевания людей требует немедленной организации методов борьбы и профилактики. Культура протосколексов *E. multilocularis* необходима для получения первичной и перевиваемых культур клеток, для получения антигенов паразита для проведения иммунодиагностических и иммунопрофилактических исследований при альвеолярном эхинококкозе [1–4]. Долгое время получение культуры протосколексов *E. multilocularis* проводилось методами, включающими в себя измельчение эхинококковой цисты, ручное перетирание и отстаивание (патент № 1839182 от 30.12.1993). В основу нашего способа был положен быстрый биологический, биохимический принцип выделения и очистки протосколексов паразита от соединительной ткани ларвоцист. Циркулируя в природе, ларвоциста с протосколексами проглатывается окончательным хозяином вместе с промежуточным (чаще всего с грызуном) и подвергается естественному перевариванию в желудочном соке. Методы, основанные на переваривании тканей в искусственном желудочном соке (ИЖС), хорошо зарекомендовали себя, при извлечении тканевых паразитозов из органов и тканей, при трихинеллезе или при оценке перорального заражения лабораторных мышей инвазионными яйцами *Toxocara canis* с последующим анализом количества прижившихся миграционных личинок [5]. По результатам проведенных исследований был получен патент на изобретение № 2665781 С1.

Целью работы было изобретение нового способа получения чистой, жизнеспособной культуры протосколексов *E. multilocularis* путем переваривания в искусственном желудочном соке фрагментов ларвоцист эхинококка.

Материалы и методы. 1. Получение эхинококковых ларвоцист. Эхинококковые ларвоцисты получали от белых крыс массой 160–180 г экспериментально зараженных внутрибрюшинно в дозе 1500–2000 инвазивных протосколексов с антибиотиками. Зараженные животные подвергались эвтаназии (в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных»), вскрывались, а ларвоцисты иссекались. Полученные ларвоцисты промывались, взвешивались и использовались для выделения чистых жизнеспособных протосколексов *E. multilocularis*.

2. Подготовка полученного биоматериала из ларвоцист *E. multilocularis* для выделения чистой культуры протосколексов и оценка жизнеспособности выделенных протосколексов. Ларвоцисты паразита подвергли измельчению через мясорубку с диаметром решетки 3–4 мм. Смешивали с ИЖС из расчета 1:10 (1 г фрагментов ларвоцист на 15 мл раствора) следующего состава: вода водопроводная – 1000 см³ (температура 41–42 °С); кислота соляная концентрированная (удельная масса 1,2) – 10 см³; пепсин пищевой – 6,0 г; NaCl – 9,0 г. Приготовленный раствор заливали в аппарат для выделения личинок трихинелл «Gastros-2m» и запускали режим прогревания до 41–42 °С. Полученную измельченную пробу закладывали в колбу аппарата и помещали в реактор и прогретый ИЖС. Время экспозиции в режиме переваривания при постоянном автоматическом перемешивании – 50 минут и постоянной температуре 41–42 °С, время отстаивания – 10 минут. Полученный перевар в объеме 30–50 см³ сливали из реактора по истечении 10-минутного отстаивания. Далее смесь взбалтывали и после 5 мин отстаивания удаляли всю надосадочную жидкость, заменяя ее свежим физиологическим раствором 37 °С до конечного объема 50 мл. После отстаивания в течение 5 минут процедуру повторяли. Данная операция повторялась до тех пор, пока надосадочная жидкость не становилась прозрачной.

Результаты исследований. Жизнеспособность выделенных протосколексов оценивали путем микроскопии осадка при увеличении объектива 4×10 по их целостности, двигательной активности и наличию/отсутствию инородных примесей. Получение культуры протосколексов эхинококка считается эффективным и пригодной к дальнейшему использованию, если в поле зрения присутствуют не менее 95% жизнеспособных активно двигающихся протосколексов *E. multilocularis* без включения инородных элементов. Повышение качества получаемой культуры протосколексов, помимо увеличения ее количества, является ключевым моментом исследований по поиску оптимальных способов выделения протосколексов паразита. Метод выделения через мельничные газ предусматривает применение ручного труда на всех этапах выделения культуры. При данном способе в культуру могут выделяться как жизнеспособные, так и нежизнеспособные протосколексы и иные элементы, такие как обрывки капсул, клетки ларвоцист, гной переродившихся цист, ткани хозяина и прочее.

Заключение. Предложенный нами способ не является очевидным, так как никто в мире до нас никогда не получал культуру протосколексов путем переваривания ларвоцист в искусственном желудочном

соке. Новый запатентованный способ выделения протосколексов *E. multilocularis* путем переваривания в ИЖС показал высокую эффективность и производительность, обеспечив выделение только жизнеспособных протосколексов.

Список источников

1. Бережко В. К., Руднева О. В., Сасикова М. Р. Протективные свойства антигена из протосколексов *Echinococcus multilocularis* в комплексе с иммуномодулирующим препаратом ронколейкином при вторичном альвеолярном эхинококкозе // Российский паразитологический журнал. 2017. № 1. С. 66-72.
2. Бережко В. К., Руднева О. В., Успенский А. В., Сасикова М. Р. Иммуномодуляторы в комплексе с антигеном из протосколексов *Echinococcus multilocularis* в профилактике экспериментального альвеолярного эхинококкоза // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2017. № 3. С. 20-24.
3. Ковешникова Е. И., Новик Т. С., Написанова Л. А., Чукина С. И., Руднева О. В. Оценка кариопатического действия и общей переносимости экстрактов *Trichinella spiralis* и *Echinococcus multilocularis* у мышей // Российский паразитологический журнал. 2020. Т. 14. № 4. С. 90-98. <https://doi.org/10.31016/1998-8435-2020-14-4-90-98>
4. Руднева О. В. Диагностическая эффективность клеточных метаболитов – антигенов протосколексов ларвоцист *Echinococcus multilocularis* при цистном эхинококкозе // Труды Всероссийского НИИ гельминтологии им. К. И. Скрябина. 2005. Т. 41. С. 305-311.
5. Руднева О. В., Бережко В. К., Написанова Л. А. Оценка протективной эффективности антигена *Toxocara canis* в комплексе с иммуностимулятором при токсокарозе на лабораторной модели // Сб. науч. ст. по матер. докл. научн. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». 2017. № 18. С. 404-406.

References

1. Berezhko V. K., Rudneva O. V., Sasikova M. R. Protective properties of antigen from *Echinococcus multilocularis* protoscolexes in combination with the immunomodulatory drug Roncoleukin in secondary alveolar echinococcosis. *Russian Journal of Parasitology*. 2017; 1: 66-72. (In Russ.)
2. Berezhko V. K., Rudneva O. V., Uspensky A. V., Sasikova M.R. Immunomodulators in combination with antigen from *Echinococcus multilocularis* protoscolexes in the prevention of experimental alveolar echinococcosis. *Medical parasitology and parasitic diseases*. 2017; 3: 20-24. (In Russ.)
3. Koveshnikova E. I., Novik T. S., Napisanova L. A., Chukina S. I., Rudneva O. V. Evaluation of karyopathic effect and general tolerance of *Trichinella spiralis* and *Echinococcus multilocularis* extracts in mice. *Russian Journal of Parasitology*. 2020; 14(4): 90-98. (In Russ.). <https://doi.org/10.31016/10.31016/1998-8435-2020-14-4-90-98>
4. Rudneva O. V. Diagnostic efficiency of cellular metabolites – antigens of protoscolexes of *Echinococcus multilocularis* larvocysts in cystic echinococcosis. *Proceedings of the All-Russian Research Institute of Helminthology named after K. I. Scriabin*. 2005; 41: 305-311. (In Russ.)
5. Rudneva O. V., Berezhko V. K., Napisanova L. A. Assessment of the protective efficacy of the *Toxocara canis* antigen in combination with an immunostimulant for toxocarosis on a laboratory model. *Materials of the Scientific Conference "Theory and practice of parasitic disease control"*. 2017; 18: 404-406. (In Russ.)