

УДК 619:616.995.1-07

DOI:

Поступила в редакцию: 03.03.2016

Принята в печать: 10.03.2017

Для цитирования:

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*. – М., 2017. – Т.39. – Вып.1. – С.

For citation:

Berezhko V. K., Rudneva O.V., Sasikova M.R. Protective properties of *Echinococcus Multilocularis* protoscoleces antigens in combination with the immunomodulator Ronkoleukin in secondary alveolar echinococcosis. *Russian Journal of Parasitology*, 2017, V.39, Iss.1, pp.

**ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА АНТИГЕНА ИЗ ПРОТОСКОЛЕКСОВ
ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS В КОМПЛЕКСЕ С
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМ ПРЕПАРАТОМ РОНКОЛЕЙКИНОМ
ПРИ ВТОРИЧНОМ АЛЬВЕОЛЯРНОМ ЭХИНОКОККОЗЕ.**

Бережко В.К., Руднева О.В., Сасикова М.Р.

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К.И. Скрябина, 117218, Москва, ул. Б.Черёмушкинская, д.28, e-mail: berejko@vniigis.ru, olgaru79@mail.ru, marina_sasikova@mail.ru

Реферат

Цель исследования – оценка протективного эффекта клеточного антигена (КЛА) протосколексов *E. multilocularis* в комплексе с иммуномодулятором ронколейкином при экспериментальном альвеолярном эхинококкозе.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили клеточные антигены (КЛА), – метаболиты культивируемых в искусственной питательной среде клеток протосколексов *E. multilocularis* [Бережко В.К. с соавт. 2001] и иммуномодулятор ронколейкин, – лекарственная форма рекомбинантного интерлейкина-2 человека (рИЛ-2). Исследования проводили на 48 белых беспородных мышах, массой 18-20 г, распределенных на 4 равноценные группы. Первой группе мышей ввели подкожно 2-кратно с интервалом 10 дней ронколейкин в дозе 180 МЕ в 0,2 мл стерильного 0,9%-ного раствора хлорида натрия; второй – по той же схеме КЛА в дозе 60 мкг белка антигена на мышь и ронколейкин в той же дозе; третьей – по той же схеме КЛА в дозе 60 мкг белка/мышь. Четвертой группе (контроль) аналогичным способом вводили по 0,2 мл стерильного 0,9%-ного раствора хлорида натрия. Через 20 дней всех мышей заразили протосколексами и ацефалоцистами *E. multilocularis* в дозе 750±50 экз/мышь. На 90-й день инвазии провели убой и вскрытие подопытных мышей в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Результаты и обсуждение. Результаты эксперимента показали, что эффект защиты в группе мышей, получавших ронколейкин, составил 58,3%; КЛА протосколексов – 66,7%, а комплексный препарат из ронколейкина и КЛА – 83,3%. В группе мышей, получавших комплексный препарат, только у 2 обнаружили единичные ларвоцисты на паренхиме печени без зародышевых элементов. В двух других группах ларвоцисты паразита регистрировали у 5 и 4 мышей соответственно, массой 125,3±21,8 – 142,2±38,02 мг, размером 11,98±4,2 –

12,35±3,46 мм.

Мыши контрольной группы были все заражены. В брюшной полости и во внутренних органах обнаружены многочисленные ларвоцисты, размером 15,64±1,46 мм и массой 580,8±222,09 мг с развившимися жизнеспособными протосколексами.

Ключевые слова: *Echinococcus multilocularis*, протосколексы, клеточный антиген, иммуномодулятор, ронколейкин, альвеолярный эхинококкоз

Введение

Одним из способов повышения иммунной реактивности животных при инвазионных патологиях является использование антигеноактивных препаратов паразитов в комплексе с иммуномодулирующими средствами различной природы, воздействующими избирательно на отдельные популяции клеток иммунной системы, что в конечном итоге может обеспечить одновременное усиление естественной резистентности и специфических иммунных механизмов протективной направленности.

В научной литературе имеется достаточное количество данных об эффективности использования различных адьювантных средств (полный и неполный адьюванты Фрейнда, гидроокись алюминия, вакцина BCG, Bordetella и др.) в составе вакцинных препаратов против гельминтозов, включая и ларвальные эхинококкозы [3, 13, 15, 17, 20].

В последнее время в качестве регуляторов иммунореактивности организма животных при различных инфекционных и инвазионных заболеваниях в ветеринарной медицине одновременно с лечебными средствами и антигенными специфическими препаратами стали применять иммуностимуляторы широкого спектра действия, которые в большинстве своем не только повышают реактивность, но и поддерживают баланс иммунокорректирующих клеток и обеспечивают, таким образом, нормальный гомеостаз организма [1, 5-10].

Исходя из представленных научных данных, есть основание полагать, что использование иммуностимулирующих средств, особенно обладающих адьювантными свойствами, в комбинации с антигенами паразитов позволит не только потенцировать защитный эффект, но также снизить дозу специфических антигенных препаратов, используемых в иммунопрофилактических исследованиях.

Цель настоящей работы заключается в оценке протективных свойств клеточного антигена (Кл АГ) протосколексов *E. multilocularis* в комплексе с иммуномодулятором при вторичном альвеолярном эхинококкозе.

Материалы и методы

Изучение иммунопрофилактических свойств антигена протосколексов *E. multilocularis* провели на белых беспородных мышах с использованием иммуномодулятора ронколейкина.

Иммуномодулятор ронколейкин представляет собой лекарственную форму рекомбинантного интерлейкина-2 человека (рИЛ-2), в состав которого входят вспомогательные вещества: солубилизатор-додецилсульфат натрия, стабилизатор-Д-маннит и восстановитель-дитиотреитол. По внешнему виду — прозрачная опалесцирующая жидкость.

Антиген протосколексов *E. multilocularis* представляет собой метаболиты культивируемых клеток протосколексов паразита в искусственной питательной среде [3].

Перед проведением эксперимента определили дозу антигена в объемном выражении из расчета 60 мкг белка-антигена /мышь и ронколейкина в количестве 180 МЕ/мышь в 0,2 мл стерильного 0,9%-ного раствора хлорида натрия.

Опыт провели на 48 белых беспородных мышах, массой 18-20г., распределенных на 4 равноценные группы по 12 мышей в каждой.

Мышам 1-й группы ввели подкожно 2-кратно с интервалом 10 дней ронколейкин в дозе 180 МЕ в 0,2 мл стерильного 0,9%-ного раствора хлорида натрия. Второй группе мышей ввели по той же схеме антиген в дозе 60 мкг/мышь в комплексе с ронколейкином в дозе 180 МЕ/мышь в 0,2 мл того же раствора. Мышам 3-й группы аналогичным способом вводили

только специфический антиген в той же дозе. Мыши 4-й группы служили контролем и в те же сроки получали по 0,2 мл раствора хлорида натрия.

Спустя 20 дней после цикла иммунизации экспериментальные животные были заражены протосколексами и ацефалоцистами *E. multilocularis* в дозе 750±50 экз/мышь. На 90-й день инвазии провели убой и вскрытие экспериментальных животных в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Результаты и обсуждение

Анализ данных опыта, представленных в таблице, свидетельствует о том, что все использованные препараты обладают протективным действием с разной степенью защитного эффекта. Наибольшую протективную эффективность проявил комплексный препарат, в состав которого помимо иммуномодулятора ронколейкина входил специфический антиген паразита.

Таблица
Оценка протективного действия клеточного антигена протосколексов *Echinococcus multilocularis* в комплексе с иммуномодулятором ронколейкином

№ п/п	Кол-во животных в группе, шт	Иммуномодулятор, доза	Доза протосколексов, шт	Количество заразившихся животных	Эффективность защиты
1	12	Ронколейкин в дозе 180 МЕ/мышь в 0,2 мл стерильного 0,9%-NaCl	750±50	5	58,3%
2	12	клеточный АГ в дозе 60 мкг белка-антигена /мышь	750±50	4	66,7%
3	12	Ронколейкин+КЛ АГ в дозе 180 МЕ/мышь в 0,2 мл стерильного 0,9%-NaCl + 60 мкг белка-антигена /мышь	750±50	2	83,3%
4	12	0,2 мл 0,9% NaCl	750±50	12	0%

Мыши, которых иммунизировали этим антигеном в комплексе с ронколейкином, оставались после проверочного заражения свободными от инвазии на 83,3%. Только у 2 мышей из 12 обнаружили единичные ларвоцисты на паренхиме печени, при микроскопии которых зародышевые элементы не регистрировали. Что касается мышей 1-й группы, которым вводили только иммуномодулятор ронколейкин без специфического антигена, защитный эффект у них был в пределах 58,3%. У 5 мышей этой группы были обнаружены ларвоцисты *E. multilocularis* в брюшной полости размером 11,98±4,2 мм и массой 142,2±38,02 мг, две из них с зародышевыми элементами. Аналогичный анализ, проведенный в группе мышей, иммунизированных только специфическим антигенным препаратом, показал протективный эффект в пределах 66,7%. У четырех мышей этой группы были обнаружены ларвоцисты в брюшной полости, у одной — с зародышевыми элементами. Размер обнаруженных ларвоцист паразита у этих мышей в среднем был 12,35±3,46 мм, а масса их 125,25±21,8 мг. Таким образом, протективный эффект у мышей, получивших по схеме только иммуномодулятор ронколейкин или антиген протосколексов *E. multilocularis*, был ниже на 25% и 16,6% соответственно.

У мышей контрольной группы, которым вводили стерильный 0,9%-ный раствор хлорида натрия, обнаружили в брюшной полости и во внутренних органах многочисленные ларвоцисты, размером в среднем 15,64±1,46 мм и массой 580,8±222,09 мг, с развившимися жизнеспособными протосколексами.

Оценка иммунопрофилактических свойств антигенов клеточной культуры протосколексов эхинококков представляет не только научный, но и значительный практический интерес, поскольку при положительном эффекте они могут служить основой

для создания вакцинных препаратов при ларвальных эхинококкозах.

Основным сдерживающим фактором создания и масштабного применения иммунопрофилактических средств при цестодозах является отсутствие постоянного источника специфического антигенного материала. С этих позиций клеточная технология может значительно облегчить процесс получения антигеноактивных препаратов путем культивирования клеток различных органов и тканей цестод в искусственных питательных средах. Полученные при этом метаболиты являются активными иммуногенами, что было экспериментально установлено, например, в отношении продуктов метаболизма культуры клеток протосколексов *E. granulosus*, *E. multilocularis* и *Taenia multiceps* (1) [4, 11, 12].

В последующих предварительных экспериментах по оценке иммунопрофилактических свойств метаболитов клеточной культуры протосколексов *E. multilocularis* при вторичном альвеолярном эхинококкозе на мышах установили наличие в них антигенного компонента, обладающего протективным действием.

Иммунохимический анализ клеточных метаболитов протосколексов *E. multilocularis*, проведенный реакцией иммунодиффузии в агаровом геле с референс положительными сыворотками больных альвеококкозом людей и с сыворотками мышей, экспериментально зараженных *E. multilocularis*, взятых в разные сроки инвазии, не только подтвердил присутствие в этом материале антигенов паразита, но и показал идентичность их с функциональными антигенными компонентами, регистрируемыми в экстракте вторичных ларвоцист паразита.

О возможности индукции протективного иммунитета при вторичном эхинококкозе у мышей посредством иммунизации их поверхностным антигеном протосколексов паразита имеется сообщение Hernández A., Nieto A. [14].

В то же время в экспериментах Адельшина Ф.К. и др. [2], по изучению протективных свойств различных антигенов *E. multilocularis* были получены неоднозначные результаты.

Авторы в отдельных случаях наблюдали замедление роста паразита у иммунизированных мышей, в других – иммунизация наоборот активизировала процесс его развития. Противоречивость результатов исследований авторов, на наш взгляд, могла быть следствием некорректной постановки эксперимента, а именно очень коротким промежутком времени (3 дня) между проведением иммунизационного цикла и проверочного заражения. Именно такой подход мог привести к «перегрузке» иммунной системы большинства экспериментальных животных, что естественно завершилось обратным эффектом.

Исходя из этих соображений мы в своих исследованиях для потенцирования защитной иммунной реакции использовали, во-первых, небольшие дозы специфического антигена, а для усиления иммунореактивности вводили его в комплексе с иммуномодулятором – ронколейкином, увеличив при этом интервал между иммунизациями в пределах 10 дней и проверочным заражением в пределах 20 дней.

Такой подход позволил активизировать защитные механизмы, что проявилось достаточно высоким уровнем резистентности экспериментальных мышей к последующему заражению.

Необходимо также отметить, что ронколейкин, введенный подопытным мышам без специфического антигенного препарата, также оказывал определенное активное влияние на развитие протективной реакции, обеспечивающей защиту от заражения на 58,3%.

Ронколейкин направленно влияет на рост, дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, увеличивает синтез всех изоформ иммуноглобулинов плазматическими клетками. Он уменьшает уровень спонтанного апоптоза Т-лимфоцитов хелперов, увеличивает выработку интерферона α , β , γ . Его присутствие активизирует цитолитическую активность натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, что, как показали наши опыты, сопровождалось потенцированием защитных механизмов мышей от заражения *E. multilocularis* до 58,3%, а в комплексе со специфическим антигеном протосколексов паразита до 83,3%. В то же время максимальный уровень защитного эффекта клеточного антигена протосколексов *E. multilocularis* без иммуномодулирующего препарата,

как правило, не превышал 58-66%.

Таким образом, во всех проводимых экспериментах было убедительно показано преимущество комплексного препарата, включающего специфический антиген и иммуностимулирующее средство, в достижении наилучшего защитного эффекта. Наши данные фактически не расходятся с выводами других исследователей, использовавших при гельминтозах в качестве средств потенцирования защитных механизмов организма животных различные иммуномодуляторы и адъювантные средства, повышающие иммуногенность антигенов гельминтов [10, 15, 16, 19, 22].

Не вызывает сомнения тот факт, что иммунопрофилактика является важным звеном в системе мер борьбы с такими опасными зоонозами, как ларвальные эхинококкозы, поскольку она позволяет, с одной стороны, повысить сопротивляемость организма к заражению, а с другой, значительно уменьшить количество и инвазивность выделяемого иммунным организмом гельминтного начала во внешнюю среду, обеспечивая тем самым ее сохранность от загрязнения.

Тем не менее при разработке паразитарных вакцин, как считают Mc Laren D.S., Terry R.S.[18], важным является преодоление таких трудностей как подавление эволюционно выработанных паразитом механизмов защиты от воздействия иммунной системы хозяина и механизмов развития иммунопатологических состояний, поскольку паразитарные болезни в основном протекают на фоне нарушения иммунологической реактивности.

С этих позиций применение иммуностимулирующих – иммуномодулирующих препаратов способствует нормализации иммунных процессов за счёт активизации всех составляющих компонентов иммунной системы, включая развитие цитолитической активности натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов хелперов. Последнее особенно важно, поскольку, как указано выше, при паразитарных заболеваниях многие паразиты выживают, благодаря наличию у них эволюционно выработанных механизмов защиты, являющихся следствием сближения структуры их белков с белками хозяина [21]. Именно это сближение структуры белков, которое произошло в результате параллельной эволюции паразита и хозяина, приводит к тому, что многие паразитарные белки не проявляют свои иммуногенные свойства в организме инвазированного хозяина, что создаёт трудности в иммунодиагностике и иммунопрофилактике гельминтозов и способствует существованию паразитов в организме хозяина довольно длительный период времени.

Заключение

Проведенные исследования по оценке протективных свойств антигенов протосколексов *Echinococcus multilocularis* в комплексе с иммуномодулятором ронколейкином убедительно показали перспективность такого подхода в иммунопрофилактике.

Литература

1. Адельшин Ф.К. Подходы к иммунотерапии экспериментального альвеококкоза линейных мышей и крыс с использованием иммуномодулятора. // Актуальн. проб. мед. и вет. паразитол тез. докл. междунар. науч. конф. Витебск – 1993. – С. 22.
2. Адельшин Ф.К., Баллад Н.Е., Коваленко Ф.П. Оценка протективной активности очищенных фракций альвеококкового антигена при экспериментальном альвеококкозе линейных мышей // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 1983. – №2. – С. 21–26.
3. Бережко В.К., Клёнова И.Ф., Коваленко Ф.П. Иммунопрофилактические свойства антигенов клеточной культуры метацестоды *Echinococcus multilocularis* при экспериментальном альвеолярном гидатидозе мышей // Труды Всерос. ин-та гельминтол. – 2001. – т. 37 – С. 34–41.
4. Бережко В.К., Кленова И.Ф. Диагностические свойства антигена протосколексов *Echinococcus multilocularis* // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: материалы докладов научной конференции ВИГИС – 2013. – вып. 14. – С. 58–60.

5. Бережко В.К., Сасикова М. Р. Антигены клеточной культуры протосколексов *Echinococcus multilocularis* в иммунопрофилактике эхинококкоза (*Echinococcus granulosus*) собак // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: материалы докладов научной конференции ВИГИС –2010. вып.11. – С. 55 – 58.
6. Ожерелков С. В., Васильев И.К., Наровлянский А.Н. и др. Применение препарата сальмозан в качестве детоксиканта в условиях эксперимента и при подключении в схему лечения заболеваний различной этиологии мелких домашних животных // Материалы XV Московского международного конгресса по болезням МДЖ. – 2007.
7. Руднева О.В., Написанова Л.А., Бережко В.К., Тхакахова А.А. Протективное действие современных иммуностимулирующих препаратов на зараженных мышей личинками (Т.С) // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: материалы докладов научной конференции ВИГИС –2014. – вып.15. – С. 259 – 262.
8. Санин А.В., Васильев И. К., Ожерелков С. В. и др. Применение максидина и сальмозана при лечении инфекционных заболеваний собак и кошек. // Ветеринарный доктор. – 2007. – №12.
9. Санин А.В. Применение иммуномодулятора при вирусных заболеваниях мелких домашних животных // Российский журнал ветеринарной медицины. – 2005. – №1. – С. 38–42.
10. Сасикова М.Р., Бережко В.К. Защитные свойства иммуномодулятора гала – вет в комплексе с клеточным антигеном *Echinococcus multilocularis* при экспериментальном гидатидозе. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 2007. – № 4. – С. 26 – 28.
11. Сивкова Т.Н., Бережко В.К. Эффективность антигенов клеточной культуры протосколексов *Echinococcus granulosus* и *Echinococcus multilocularis* в диагностике цистного гидатидоза свиней // Ветеринария. – 2002.– № 10. – С. 32–34.
12. Тхакахова А.А., Бережко В.К. Сероэпизоотический мониторинг эхинококкоза овец в Кабардино–Балкарской Республике // Российский паразитологический журнал. – 2012. – № 3. – С. 103–109.
13. Dang Z., Yagi K., Oku Y., Kouguchi H., Kajino K., Matsumoto J., Nakao R., Wakaguri H., Toyoda A., Yin H., Sugimoto C. A pilot study on developing mucosal vaccine against alveolar echinococcosis (AE) using recombinant tetraspanin 3: vaccine efficacy and immunology. PLoS Negl Trop Dis, 2012, vol. 6, no. 3. e1570. doi: 10.1371/journal.pntd.0001570. PMID: 22479658. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479658> (Accessed Epub 2012 Mar 27).
14. Hernández A., Nieto A. Induction of protective immunity against murine secondary hydatidosis. Parasite Immunol, 1994, vol.16, no.10, pp. 537– 44, PMID: 7532851.
15. Harrison Y. B. L., Shakes T. R., Robinson C. M., Lawrence S. B., Heath D. D., Dempster R. P., Lightowers M. W., Rickard M. D. Duration of immunity, efficacy and safety in sheep of a recombinant *Taenia ovis* vaccine formulated with saponin or selected adjuvants. Vet. Immunol. And Immunopathol, 1999, vol. 70, no. 3–4, pp. 161–172.
16. Hashemitabar G. R., Razmi G. R. and Naghibi A. Trials to Induce Protective Immunity in Mice and Sheep by Application of Protoscolex and Hydatid Fluid Antigen or Whole Body Antigen of *Echinococcus granulosus*. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health, 2005, vol. 52, no.5, pp. 243–245.
17. Li W.G., Wang H., Zhu Y.M. Change of splenocyte lymphokines in mice induced by recombinant BCG–Eg95 vaccine against *Echinococcus granulosus*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 2007, vol.25, no. 2, pp. 109–13. Chinese. MID: 17633820;
18. Mc Laren D. J., Terry R. J. Antiparasite vaccines. Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyd. 1989, vol. 83, no. 2, pp. 145–146.
19. Shi Zhiyun, Wang Yana, Li Zongji, Ma Rui, ZhaoWei. Cloning, Expression, and Protective Immunity in Mice of a Gene Encoding the Diagnostic Antigen P–29 of *Echinococcus Granulosus*. Acta Biochim Biophys Sin, 2009, vol. 41, pp. 79–85.

20. Tuerxun Z., Yimiti D., Cao C. B., Ma H. M., Li Y. J., Zhou X. T., Zhu M., Ma X. M., Wen H., Ding J. B. Construction and expression of the *Echinococcus granulosus* recombinant BCG–EgG1Y162. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 2013, vol. 31, no. 2, pp.110–3. Chinese.PMID: 24809190
21. Vuitton D.A., Gottstein B. *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of parasite–host interplay. *J Biomed Biotechnol.*, 2010:923193. doi: 10.1155/2010/923193. Epub 2010 Mar 21.
22. Xu X.Y., Emery I., Liance M. et al. Protective immunity in sheep induced by oncosphere antigen of *Echinococcus* 16th Int. Congr. of Hydatidol., Beijing, Oct. 12–16, 1993. Beijing, China, 1993, pp. 303.

References

1. Adel'shin F.K. Approaches to the immunotherapy of experimental alveococcosis in linear mice and rats with the use of immunomodulators. *Aktual'n. prob. med. i vet. parazitolog. dokl. mezhdunar. nauch. konf.* [Proc. int. sci. pract. conf. «Current problems of med. and vet. parasitol. »]. Vitebsk, 1993. 22p. (In Russian)
2. Adel'shin F.K., Ballard N.E., Kovalenko F.P. Assessment of protective activity of purified alveococcus antigen fractions in experimental alveococcosis of linear mice. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni* [Medical parasitology and parasitic diseases], 1983, no.2, pp. 21–26. (In Russian)
3. Berezhko V.K., Klyonova I.F., Kovalenko F.P. Immunoprotective properties of cell antigens from metacestode *E. multilocularis* at experimental alveolar hydatidosis in mice. *Trudy Vseros. in-ta gel'mintol.* [Proc. All-Russ. Inst. of Helminthol.], 2001, vol.37, pp.34–41. (In Russian)
4. Berezhko V.K., Klyonova I.F. Diagnostic properties of *Echinococcus multilocularis* protoscolexes. *Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami: materialy dokladov nauchnoy konferentsii VIGIS* [Proc. of sci. conf. VIGIS «Theory and practice of the struggle against parasitic diseases»], 2013, i.14, pp.58–60. (In Russian)
5. Berezhko V.K., Sasikova M. R. Cell antigens of *Echinococcus multilocularis* protoscolexes in the immunoprophylaxis of canine echinococcosis (*Echinococcus granulosus*). *Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami: materialy dokladov nauchnoy konferentsii VIGIS* [Proc. of sci. - conf. VIGIS «Theory and practice of the struggle against parasitic diseases»], 2010, i. 11, pp.55 – 58. (In Russian)
6. Ozherelkov S. V., Vasil'ev I.K., Narovlyanskiy A.N. The use of the drug Salmozan under experimental conditions as a detoxicant and for introduction into the treatment regimens of small domestic animals diseases of different etiology. *Materialy XV Moskovskogo mezhdunarodnogo kongressa po boleznyam MDZh* [Proc. int. sci. vet. Congr. on diseases of small domestic animals]. M., 2007. (In Russian)
7. Rudneva O.V., Napisanova L.A., Berezhko V.K., Thakahova A.A. Protective effects of the modern immunostimulators on Ts-infected mice. *Teoriya i praktika bor'by s parazitarnymi boleznyami: materialy dokladov nauchnoy konferentsii VIGIS* [Proc. of sci. - pract. conf. VIGIS «Theory and practice of the struggle against parasitic diseases»], 2014, i.15, pp. 259 – 262. (In Russian)
8. Sanin A.V., Vasil'ev I. K., Ozherelkov S. V. The use of Maxidine and Salmozan for the treatment of infectious diseases in dogs and cats. *Veterinarnyi doctor* [Veterinary physician], 2007, no.12. (In Russian)
9. Sanin A.V. The use of immunomodulators in viral diseases of small domestic animals. *Rossiyskiy zhurnal veterinarnoy meditsiny* [Russian veterinary journal], 2005, no.1, pp. 38–42. (In Russian)
10. Sasikova M.R., Berezhko V.K. Protective properties of immunomodulator Gala-Vet in combination with the cell antigen of *Echinococcus multilocularis* in experimental hydatidosis. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni* [Medical parasitology and parasitic diseases], 2007, no. 4, pp. 26 –28. (In Russian)

11. Sivkova T.N., Berezhko V.K. Efficacy of antigens from *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* protoscoleces for the diagnosis of cystic hydatidosis in pigs. *Veterinariya*. [Veterinary medicine], 2002, no.10, pp. 32–34. (In Russian)
12. Thakahova A.A., Berezhko V.K. Sero-epizootic monitoring of echinococcosis in sheep from Kabardino-Balkaria. *Rossijskiy parazitologicheskiy zhurnal* [Russian journal of parasitology], 2012, no. 3, pp.103–109. (In Russian)
13. Dang Z., Yagi K., Oku Y., Kouguchi H., Kajino K., Matsumoto J., Nakao R., Wakaguri H., Toyoda A., Yin H., Sugimoto C. A pilot study on developing mucosal vaccine against alveolar echinococcosis (AE) using recombinant tetraspanin 3: vaccine efficacy and immunology. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, vol. 6, no. 3. e1570. doi: 10.1371/journal.pntd.0001570. PMID: 22479658. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479658> (Accessed Epub 2012 Mar 27).
14. Hernández A., Nieto A. Induction of protective immunity against murine secondary hydatidosis. *Parasite Immunol*, 1994, vol.16, no.10, pp. 537–44, PMID: 7532851.
15. Harrison Y. B. L., Shakes T. R., Robinson C. M., Lawrence S. B., Heath D. D., Dempster R. P., Lightowers M. W., Rickard M. D. Duration of immunity, efficacy and safety in sheep of a recombinant *Taenia ovis* vaccine formulated with saponin or selected adjuvants. *Vet. Immunol. and Immunopathol*, 1999, vol. 70, no. 3–4, pp.161–172.
16. Hashemitabar G. R., Razmi G. R. and Naghibi A. Trials to Induce Protective Immunity in Mice and Sheep by Application of Protoscolex and Hydatid Fluid Antigen or Whole Body Antigen of *Echinococcus granulosus*. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2005, vol. 52, no. 5, pp. 243–245.
17. Li W.G., Wang H., Zhu Y.M. Change of splenocyte lymphokines in mice induced by recombinant BCG–Eg95 vaccine against *Echinococcus granulosus*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 2007, vol.25, no. 2, pp. 109–13. Chinese. MID: 17633820;
18. Mc Laren D. J., Terry R. J. Antiparasite vaccines. *Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyd.*, 1989, vol. 83, no. 2, pp. 145–146.
19. Shi Zhiyun, Wang Yana, Li Zongji, Ma Rui, ZhaoWei. Cloning, Expression, and Protective Immunity in Mice of a Gene Encoding the Diagnostic Antigen P–29 of *Echinococcus Granulosus*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, vol. 41, pp. 79–85.
20. Tuerxun Z., Yimiti D., Cao C. B., Ma H. M., Li Y. J., Zhou X. T., Zhu M., Ma X. M., Wen H., Ding J. B. Construction and expression of the *Echinococcus granulosus* recombinant BCG–EgG1Y162. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 2013, vol. 31, no. 2, pp.110–3. Chinese.PMID: 24809190
21. Vuitton D.A., Gottstein B. *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of parasite–host interplay. *J Biomed Biotechnol*, 2010:923193. doi: 10.1155/2010/923193. Epub 2010 Mar 21.
22. Xu X.Y., Emery I., Liance M. et al. Protective immunity in sheep induced by oncosphere antigen of *Echinococcus* 16th Int. Congr. of Hydatidol., Beijing, Oct. 12–16, 1993. Beijing, China, 1993, pp. 303.

Russian Journal of Parasitology, 2017, V.39, Iss.1

Received: 30.03.2016

Accepted: 10.03.2017

PROTECTIVE PROPERTIES OF *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* PROTOSCOLEX ANTIGENS IN COMBINATION WITH THE IMMUNOMODULATOR RONCOLEUKIN IN SECONDARY ALVEOLAR ECHINOCOCCOSIS

Berezhko V.K., Rudneva O.V., Sasikova M.P.

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and

Plants named after K.I. Skryabin, 117218 Russia, 28 B. Cheremushkinskaya St., e-mail: berejko@vniigis.ru, olgaru79@mail.ru, marina_sasikova@mail.ru

Abstract

Objective of research: Estimation of protective effects of *Echinococcus multilocularis* protoscoleces cell antigens in combination with the immunomodulator Roncoleukin in experimental alveolar echinococcosis.

Materials and methods: In this experiment we used cellular antigens - *E. multilocularis* protoscoleces cell metabolites cultivated in artificial substrate [Berezhko V.K. and co-authors, 2001], and immunomodulator Roncoleukin (pharmaceutical form of recombinant human interleukin-2 (rhIL-2)). Experiments were conducted on 48 white outbred mice with the mass of 18-20 g. divided into 4 equal groups. The first group of mice received Roncoleukin twice subcutaneously, with a ten-day interval at the dose of 180 ME in 0,2 ml of sterile 0,9% sodium chloride solution; the second group (according to the same schedule) - cell antigens at the dose of 60 mcg protein antigen per mouse and Roncoleukin at the same dose; the third (according to the same schedule) - cell antigens at the dose of 60 mcg protein antigen per mouse. The fourth group (controls) received 0,2 ml of sterile 0,9% sodium chloride solution per mouse.

After 20 days, all mice were infected with protoscoleces and acoelocysts of *E. multilocularis* at the dose of 750 ± 50 ind./mouse. On the 90th day of invasion, the experimental mice were killed and underwent autopsy according to the «Rules for conducting works using experimental animals».

Results and discussion:

The results of the experiment showed that the protective effect in the first group receiving Roncoleukin was 58,3%; the third group (cell antigens of protoscoleces - 66,7%); the second group (complex preparation containing Roncoleukin and cell antigens)- 83,3%. Single larval cysts on liver parenchyma without embryonic elements were detected in 2 mice only of the group receiving a complex preparation. In the other two groups, parasitic cysts were registered in 5 and 4 mice with the mass $125,3 \pm 21,8 - 142,2 \pm 38,02$ mg and the size $11,98 \pm 4,2 - 12,35 \pm 3,46$ mm, respectively.

All mice from the control group were infected. Numerous larval cysts (size $15,64 \pm 1,46$ mm and mass $580,8 \pm 222,09$ mg) with developing viable protoscoleces were found in abdomen and internal organs.

Keywords: *Echinococcus multilocularis*, protoscoleces, cell antigen, immunomodulator, Roncoleukin, alveolar echinococcosis.

© 2017 The Authors. Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI) http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org / Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>)