

# Detectarea coproantigenelor la câinii infestați cu *Echinococcus granulosus*. Cercetări preliminare

MORARIU S., SUCIU A., COSOROABĂ I., ȚEPELEA G., DĂRĂBUȘ GH., OPRESCU I.,  
MORARIU FLORICA\*

Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

\* Facultatea de Zootehnie și Biotehnologii Timișoara

**REZUMAT.** Pentru detectarea coproantigenelor la câinele infestat cu sușa suină de *Echinococcus granulosus* au fost testate antiserurile obținute din lichidul hidatic împreună cu supernatantul fecal obținut în săptămânile 2 – 7 prin imunodifuzie în gel de agar și contraimmunoelectroforeză. Arcurile de precipitare au fost evidente pentru săptămânile 5 și 6 la antiserul obținut din precipitatul de lichid hidatic și la cel din lichidul chistic integral la imunodifuzie. La antiserul obținut din supernatantul lichidului hidatic nu s-au evidențiat arcuri de precipitare. Prin contraimmunoelectroforeză rezultatele au fost asemănătoare, dar mai pronunțate. Serurile obținute în săptămânile 9 și 10, după dehelmintizarea cu praziquantel din săptămâna 8, au fost testate împotriva supernatantului fecal din săptămânile 4 – 7, prin contraimmunoelectroforeză. Pentru toate cele opt godeuri reacția imunologică a fost pozitivă.

## INTRODUCERE

Infestațiile cu cestode la câini se diagnostică în mod obișnuit, prin examen macroscopic direct al fecalelor (pentru evidențierea proglotelor), prin examen microscopic (pentru ouă) și prin examinarea crustelor perianale. Oricum, cea mai corectă identificare se realizează, totuși, prin vermifugație cu arecolină bromhidrică. În ultimii ani însă, serodiagnosticul infestațiilor experimentale cu cestode la câini, prin ELISA, a arătat un mare grad de sensibilitate și specificitate pentru depistarea anticorpilor circulanți. Totuși, serodiagnosticul în echinococoza carnivorelor prezintă unele probleme legate de reactivitatea încrucișată și de specificitate.

De asemenea, detectarea coproantigenelor canidelor infestate constituie o metodă modernă de diagnostic în cazul infestației echinococice și nu implică riscuri majore pentru operator comparativ cu vermifugația cu arecolină bromhidrică. Majoritatea autorilor susțin că această metodă este de cel puțin două ori mai sensibilă decât detectarea anticorpilor serici prin ELISA.

În prezentul studiu, ne-am propus să detectăm, pentru prima dată în România, coproantigenele câinilor infestați, prin două metode imunologice simple, și anume, imunodifuzia în gel de agar și contraimmunoelectroforeza.

## MATERIALE ȘI METODE

### *Colectarea protoscolecșilor*

Au fost recoltați protoscolecși viabili din chisturi hidatice fertile provenite de la porci sacrificați în abatorul din comuna Giarmata.

### *Infestația experimentală*

Un câine de rasă comună a fost infestat experimental cu aproximativ  $4 \times 10^4$  protoscolecși. Câinele a fost ținut în cușcă pe plasă de sârmă și hrănit cu deșeuri alimentare de la cantina universității.

### *Colectarea și prepararea probelor de fecale*

Timp de zece săptămâni post-infestație au fost recoltate probe de fecale o dată pe săptămână. Fecalele proaspete au fost omogenizate cu o

soluție tampon (0,05M carbonat-bicarbonat tampon) în proporție de 1:10 și au fost agitate. Probele au fost centrifugate 30 minute la 2000 rpm pentru a obține un supernatant clar. Supernatantul obținut a fost conservat cu mertiolat de sodiu și stocat la 4°C, fiind folosit ca sursă de antigene. Probe de fecale provenite de la 10 câini tratați în clinica de Boli parazitare au fost prelucrate după aceeași metodologie.

#### *Obținerea serurilor*

S-au recoltat aproximativ 15 ml de sânge din vena cefalică brahială în eprubete sterile și a fost lăsat 24 ore la temperatura camerei pentru exprimarea serului. Serul a fost centrifugat 10 minute la 5000 rpm, după care a fost conservat cu mertiolat de sodiu și păstrat la 4°C. Recoltările au fost făcute săptămânal (10 săptămâni), iar serurile astfel obținute au fost testate împotriva supernatantului fecal corespunzător fiecărei săptămâni. De asemenea, serurile obținute în săptămânile 9 și 10, după administrarea praziquantelului, au fost testate împotriva supernatantului fecal din săptămânile 4, 5, 6 și 7, prin contraimmunoelectroforeză.

#### *Hiperimunizările*

Șase șobolani Wistar au fost inoculați săptămânal, timp de șase săptămâni, după următorul protocol:

- doi șobolani – cu lichid chistic integral, administrat s.c., 1 ml și i.m., 1 ml + 0,1 ml adjuvant Freund;
- doi șobolani – cu supernatant obținut din lichidul hidatic, administrat 1 ml s.c. + 1 ml i.m. + 0,1 ml adjuvant Freund;
- doi șobolani – cu precipitatul lichidului chistic, inoculat 0,5 ml s.c. + 0,1 ml adjuvant Freund.

La șase săptămâni s-a recoltat sânge direct din cord de la toți șobolani. Sângele a fost menținut 24 de ore la temperatura camerei, pentru exprimarea serului. S-au obținut astfel antiserurile, care au fost conservate cu mertiolat de sodiu și păstrate la 4°C. Antiserurile au fost utilizate pentru imunodifuzia în gel de agar și contraimmunoelectroforeză.

#### *Imunodifuzia în gel de agar*

Pe o placă de sticlă s-a turnat un strat subțire de gel de agar 1, 5%. După răcire s-au executat cinci grupuri a câte șapte godeuri fiecare, dintre care unul dispus central. Cele cinci grupuri de godeuri au fost dispuse în rozetă. La două grupuri de godeuri a fost dispus central antiserul obținut din precipitatul lichidului chistic, iar în godeurile de pe margine au fost depuse supernatanturile fecale din săptămânile 2 – 7. La alte două grupuri de godeuri s-a folosit, pentru godeul central, antiserul obținut din lichidul chistic integral iar în ultimul grup în godeul central a fost depus antiserul obținut din supernatantul lichidului hidatic. În toate cele trei grupuri amintite ulterior, în godeurile de pe margini s-au folosit aceleași supernatanturi din săptămânile 2 – 7. Placa a fost introdusă în camera umedă iar reacția imunologică s-a citit zilnic, timp de 5 zile. La fel s-a procedat și cu supernatantul fecal obținut din cele 10 probe recoltate în clinica de Boli parazitare.

#### *Contraimmunoelectroforeza*

Pe o lamă de sticlă s-a depus un gel de agar 1% de 3 mm grosime preparat în soluție tampon 0,08 M barbitonică la pH 8,2. S-au făcut două grupe a câte 8 godeuri duble dispuse la o distanță de aproximativ 6 mm unul de altul. În prima grupă de godeuri s-a utilizat antiserul obținut din lichidul chistic integral, iar în a doua grupă de godeuri s-au folosit serurile obținute din săptămâna 2 până în săptămâna 9. Atât antiserul cât și serurile au fost testate împotriva supernatantului din fecale din săptămânile 2 – 9. Placa astfel pregătită a fost introdusă în aparatul de electroforeză cu godeurile conținând antiserurile și serurile înspre anod și godeurile cu supernatant înspre catod. Electroforeza s-a realizat la un curent constant de 8 mA timp de 60 minute.

Soluția tampon utilizată pentru electroforeză a fost aceeași din care a fost preparat și agarul.

#### **REZULTATE ȘI DISCUȚII**

În ceea ce privește imunodifuzia în gel de agar (Figura 1), se poate constata că, în grupul de godeuri cu supernatant de fecale și antiser din precipitatul de lichid hidatic (A și B) apare o reacție pozitivă cu formarea arcului de precipitare pentru probele de fecale recoltate din săptămânile 5 și 6. Pentru probele de fecale din celelalte săptămâni nu au putut fi puse în evidență reacții de precipitare.

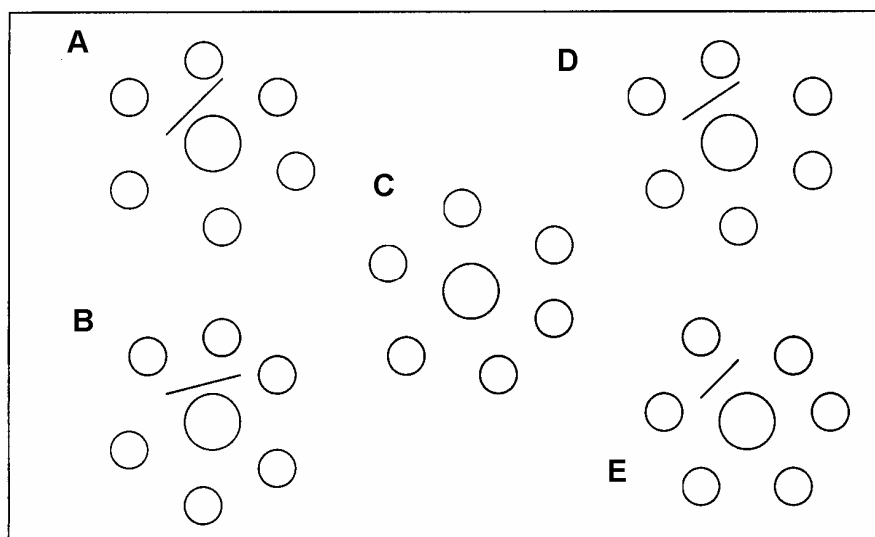


Figura 1

Reprezentarea diagramatică a imunodifuziei în gel de agar

Pentru al doilea grup de godeuri (D și E) în care s-au folosit supernatantul de fecale din săptămânile 2 – 7 cu antiserul obținut în urma inoculării la șobolani a lichidului chistic total, s-au obținut aceleași arcuri de precipitare pentru săptămânile 5 – 6, însă cu o intensitate mai slabă.

Pentru godeul în care s-a utilizat antiserul din supernatant (C) nu s-a putut evidenția arcul de precipitare. Aceasta înseamnă că, supernatantul lichidului hidatic folosit pentru hiperimunizarea șobolanilor nu are proprietăți antigenice, proprietăți care sunt întâlnite însă la lichidul chistic integral și mai ales, la precipitatul obținut din acest lichid.

Supernatantul obținut din fecalele celor 10 câini tratați în clinica de Boli parazitare a fost comparat, de asemenea, cu antiserurile produse din lichidul chistic integral, din precipitat și din supernatant. La niciuna dintre probe nu a fost pusă în evidență o reacție pozitivă, indiferent de rasa și vârsta câinilor, ceea ce înseamnă că niciunul dintre aceștia nu a fost purtător de *E. granulosus* în perioada respectivă.

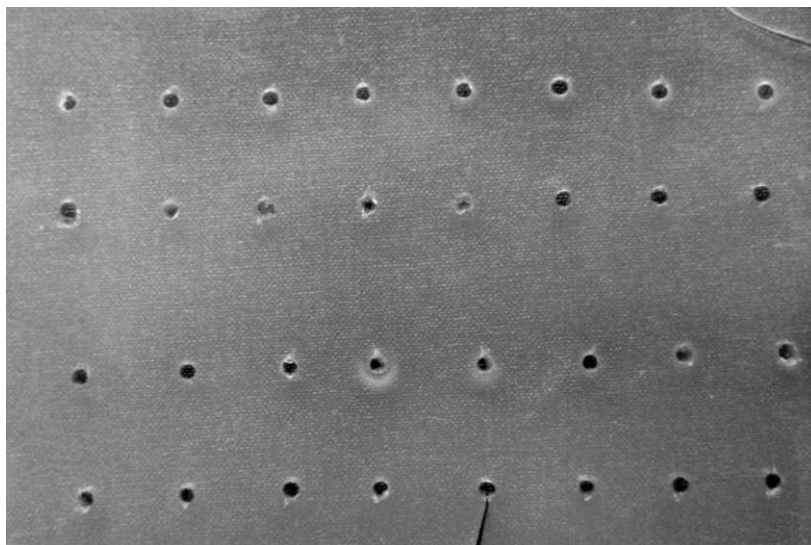
Toți cei 10 câini au fost câini de companie, fapt ce explică rezultatele negative obținute. De altfel, *Olteanu și col.* (8) arată că, în cadrul categoriei câinilor de companie extensivitatea infestației cu *E. granulosus* este extrem de scăzută (0,01%).

Rezultatele obținute la contraimmunoelectroforeză au fost asemănătoare celor observate la

imunodifuzia în gel de agar, însă mult mai pronunțate. Astfel, atât la godeurile în care s-a folosit serul obținut de la câinele infestat cât și la godeurile umplute cu antiser din lichid chistic total, la 24 de ore de la incubarea în camera umedă, au apărut arcurile de precipitare pentru probele din săptămânile 4, 5, 6 și 7. Menționăm că la probele din săptămânile 5 și 6 reacția imunologică a fost pronunțată (Foto 1).

Având în vedere faptul că aceste studii imunologice au fost efectuate pe sușa suină de *E. granulosus*, la care perioada prepatentă este de 45 – 50 de zile, se poate constata că reacțiile imunologice au fost pozitive încă înainte de atingerea maturității de către cestode. Acest fapt are o mare importanță în ceea ce privește controlul parazitologic al echinococoziei.

Examinând probele de fecale ale celor 10 câini tratați în clinica de Boli parazitare cu antiserul din lichidul chistic total nu au fost observate reacții pozitive, fapt confirmat și prin imunodifuzia în gel de agar. De altfel, *Ahmad și Nizami* (1) nu au observat arcuri de precipitare decât după 3 săptămâni post-infestație. Reacții pronunțate au fost observate la 28 și 35 de zile post-infestație, ceea ce arată că antigenele sunt prezente în fecale. Aceste constatări sunt sprijinite și de observațiile noastre, intensitatea maximă a reacțiilor imunologice fiind observată în săptămânile 5 și 6.

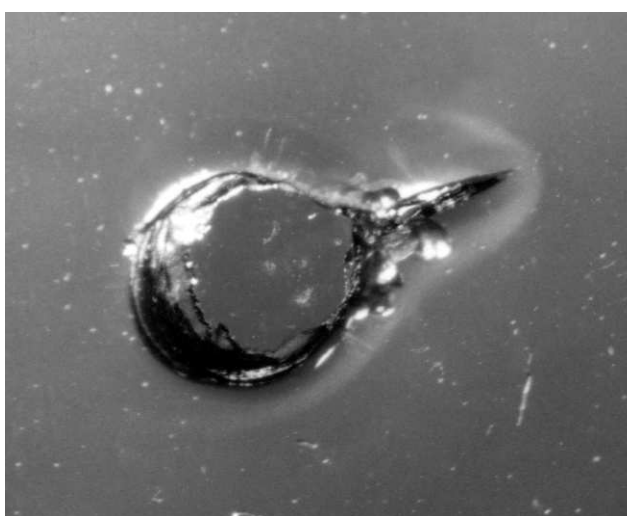


**Foto 1**  
Contraimunoelectroforeza

Testarea serurilor din săptămânile 9 și 10, după dehelmintizarea cu praziquantel din săptămâna 8, s-a făcut tot prin contraimunoelectroforeză împotriva supernatantului fecal din săptămânile 4, 5, 6 și 7. Această alegere a supernatantului s-a bazat pe faptul că la probele recoltate în aceste săptămâni impregnarea antigenică este considerabil mai mare, lucru demonstrat anterior, mai ales pentru supernatantul din săptămânile 5 și 6. Astfel, s-a putut observa că pentru toate cele opt godeuri (câte patru pentru săptămânile 9 și

10) reacția imunologică a fost pozitivă. Intensitate mai mare s-a constatat pentru godeurile din săptămâna 9 (Foto 2), pe când la probele din săptămâna 10, arcurile de precipitare au fost ușor estompate.

Pozitivitatea probelor de ser din cele două săptămâni, în lipsa cestodelor adulte din intestinul gazdei, relevă faptul că anticorpii circulanți antiechinococi sunt prezenți în serul câinelui cel puțin două săptămâni după administrarea unui produs cestodicid.



**Foto 2**  
Godeu cu ser din săptămâna 9, testat împotriva supernatantului fecal din săptămâna 6 (reacție intens pozitivă)

În studii anterioare, antigenele diferitelor specii de cestode au putut fi identificate în fecale chiar și în perioada prepatentă (2, 3, 4, 7). *Deplazes* și *col.* (5) au detectat coproantigenele diferitelor specii de *Echinococcus* sugerând că această detectare depinde de încărcătura parazitară și prezintă uneori reactivitate încrucișată cu *Taenia hydatigena*. Aceste rezultate nu pot fi confirmate deocamdată și de noi, deoarece câinele utilizat în experiment a fost infestat doar cu *E. granulosus*, iar infestația a fost medie. Oricum, în condiții naturale un câine nu adăpostește în intestinul lui subțire mai mult de 250 de exemplare de *E. granulosus* decât în mod excepțional (6). Chiar dacă studiul nostru se află în stadiu preliminar, rezultatele obținute sunt încurajatoare. Cercetările imunologice vor fi utilizate în viitorul apropiat pe o scară mult mai largă.

## CONCLUZII

- Pentru prima dată în România au fost puse în evidență coproantigenele câinilor infestați cu *E. granulosus*.
- Coproantigenele pot fi puse în evidență încă din perioada prepatentă a infestației echinococice, atât prin imunodifuzie în gel de agar cât și prin contraimmunoelectroforeză, fapt de o deosebită importanță în controlul parazitologic al echinococozii/hidatidozei.
- Anticorpul seric persistă cel puțin două săptămâni după dehelmintizarea cu produse cestodicide, la niveluri detectabile prin tehnici de imunodiagnostic.
- Contraimmunoelectroforeza este mai rapidă și mai sensibilă decât imunodifuzia în gel de agar.

- Ambele metode imunologice (contraimmunoelectroforeza și imunodifuzia în gel de agar) sunt simple și necostisitoare putând fi aplicate chiar și în laboratoarele mai puțin echipate.

## SUMMARY

### Coproantigen detection for echinococcosis in dogs. Preliminary researches

For the detection of the coproantigens as to the dog's infection with *Echinococcus granulosus* pig strain, the antisera obtained from hydatid cyst fluid have been tested together with the faecal supernatants obtained between the 2<sup>nd</sup> and the 7<sup>th</sup> week, by immunodiffusion and countercurrent immunoelectrophoresis methods. The precipitation arcs have been obvious on the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> week for the antiserum obtained out of the precipitation of hydatid cyst fluid and for that obtained out of total hydatid cyst fluid, by immunodiffusion test. No precipitation arcs have been observed to the antiserum from the supernatant of the hydatid cyst fluid. By means of countercurrent immunoelectrophoresis method the results were alike, even more accurate. The sera obtained on the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> week, after the administration with prasiquantel on the 8<sup>th</sup> week, were tested against the faecal supernatants obtained between the 4<sup>th</sup> and the 7<sup>th</sup> week. All of the eight buckets, when tested, have been positive.

## BIBLIOGRAFIE

1. AHMAD, G., NIZAMI, W. A., 1998 – Coproantigens: Early detection and suitability of an immunodiagnostic method for echinococcosis in dogs. *Vet. Parasitol.*, 77, 237 – 244.
2. ALLAN, J. C., CRAIG, P. S., 1989 – Coproantigens in gut tapeworm infection *Hymenolepis diminuta* in rats. *Parasitol. Res.*, 76, 68 – 73
3. DEPLAZES, P., GOTTSTEIN, B., STYNGELIN, Y., ECKERT, J., 1990 – Detection of *Taenia hydatigena* coproantigens by ELISA in dogs. *Vet. Parasitol.*, 36, 91 – 103.
4. DEPLAZES, P., ECKERT, J., PAWLOWSKI, Z. S., MACHOWSKA, L., GOTTSTEIN, B., 1991 – An enzyme – linked immunosorbent assay for diagnostic detection of *Taenia saginata* coproantigens in humans. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85, 391 – 396.
5. DEPLAZES, P., GOTTSTEIN, B., ECKERT, J., JENKINS, D. J., EWALD, D., JIMENEZ PALACIOS, S., 1992 – Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme – linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitol. Res.*, 78, 303 – 308.
6. GEMMELL, M. A., 1997 – Quantifying the transmission dynamics of the family Taeniidae with particular reference to *Echinococcus* spp.: an update. 54 – 71, In: *Compendium on Cystic Echinococcosis in Africa and in Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco*, Brigham Young University Print Services, Provo.
7. MACHNICKA, B., KRAWICZUK, S., 1988 – *Hymenolepis diminuta* antigen: Detection in faeces of rats. *Bull. Polish Acad. Sci. Biol. Sci.*, 35, 103 – 106.
8. OLTEANU, GH., PANAITESCU, D., GHERMAN, I., 1995 – Echinococcosis – Hydatidosis in men and animals in Romania, 92, *XVII International Congress of Hydatidology, Limassol – Cyprus*.