

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ЗАРАЖЕНИЕ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ ИНВАЗИОННЫМИ ЯЙЦАМИ *TOXOCARA CANIS*

Ерофеева В.В.<sup>1</sup>, Масленникова О.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов, 113093, г. Москва, Подольское шоссе, д. 8/5; e-mail:erofeeva-viktori@mail.ru

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Вятская государственная сельскохозяйственная академия, 610017, Киров, Октябрьский просп., 133

Исследование посвящено экспериментальному заражению дождевых червей *Eisenia fetida* через почву, обсеменённую 10000 инвазионных яиц *Toxocara canis*. Установлена миграция личинок *Toxocara canis* в тканях дождевых червей. Впервые в России проведено исследование с целью установления периода нахождения личинок токсокар в кожно-мышечном мешке и кишечнике дождевых червей. В результате проведённых опытов, выявлено, что дождевые черви *Eisenia fetida* способны заражаться инвазионными яйцами *T. canis*. Наибольшая интенсивность заражения червей отмечалась в первую неделю опыта, после перемещения заражённых червей в чистую почву. Живые личинки в теле дождевых червей регистрировались в первые две недели, в дальнейшем встречались как живые, так и неподвижные личинки. С 16 дня опыта количество личинок в дождевых червях резко сократилось по сравнению с первыми днями заражения, но они обнаруживались в 50 % исследованных червей в кожно-мышечном мешке. Личинки практически перестали регистрироваться после 38 дня опыта. Через 40 дней после заражения было выбрано 20 червей и вновь посажено в почву для повторного заражения. Установлено, что при повторном заражении дождевых червей *Eisenia fetida* инвазионными яйцами *Toxocara canis* у червей вырабатывается иммунитет, и личинки проникают в кишечник дождевого червя, но практически не внедряются в кожно-мышечный мешок. Количество личинок *T. canis* в кишечнике на протяжении опыта (48 дней) оставалось постоянным.

Ключевые слова: Токсокароз, *Toxocara canis*, *Eisenia fetida*, дождевые черви, зооноз, паратенизм.

## EXPERIMENTALLY INFECTED EARTHWORMS INVASIVE EGGS *TOXOCARA CANIS*

Erofeeva V.V.<sup>1</sup>, Maslennikova O.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia 113093, Moscow, Podolsk highway, 8/5; erofeeva-viktori@mail.ru

<sup>2</sup>Vyatka State Agricultural Academy, 610017, Kirov, October Ave., 133

Research is devoted to experimental infection of earthworms *Eisenia fetida* through the polluted soil 10000 infective eggs *Toxocara canis*. Set migration of the larvae in the tissues *Toxocara canis* earthworms. The first time in Russia conducted a study to establish the period during which the larvae *Toxocara canis* in skin-muscular sac and intestine earthworms. As a result of experiments it was revealed that the earthworms *Eisenia fetida* ability to infect invasive eggs of *T. canis*. The highest intensity worm infestation was observed in the first week of the experience, after you move the infected with worms in clean soil. Live larvae in the body earthworms were registered in the first two weeks, subsequently met both living and immobile larvae. From the 16th day of the experiment the number of larvae in earthworms decreased dramatically compared with the first days of infection, but they were found in 50% of the investigated worms in skin-muscular sac. Larvae have practically ceased to be registered after 38 days of experience. 40 days after infection, 20 were selected worms and re-planted in the soil for reinfestation. Established that at repeated infection earthworms *Eisenia fetida* invasive eggs *Toxocara canis* in worms produced some immunity, and larvae penetrate into the intestines of the earthworm, but practically no introduced into skin-muscular sac. The number of larvae of *T. canis* in the intestine during the experiment (48 days) remained steady.

Keywords: Toxocarosis, *Toxocara canis*, *Eisenia fetida*, earthworms, zoonoses, paratenism.

По оценкам Всемирной организации здравоохранения, около 2 млрд. человек в мире инвазированы геогельминтами. Вторым по распространенности геогельминтозом в Российской Федерации является токсокароз. Ежегодно в Российской Федерации выявляется до 5 тысяч случаев токсокароза. Истинное число больных значительно превышает данные

официальной статистики, так как поправочный коэффициент при данной инвазии достигает 20. Риск заражения возбудителем токсокароза возрастает в связи с увеличением численности собак на территории и высокого уровня зараженности их токсокарами [2]. По мнению В.П.Сергиева и др. [4], распространенность токсокароза в связи с его динамизмом, а также сопряженностью с соматической патологией, существенно превосходит официально регистрируемые масштабы.

Токсокароз – паразитарное заболевание, вызываемое миграцией в организме человека личинок гельминтов собак – *Toxocara canis* (Werner, 1782), реже – кошек – *Toxocara mystax* (Zeder, 1800) и характеризующееся комплексом синдромов и симптомов, обозначаемых как *visceral larva migrans*.

Инвазия токсокарами широко распространена как среди животных, так и среди людей. Для человека токсокароз – зоонозная инвазия. При массивной инвазии токсокарами в иммунной системе человека возможно развитие тяжелых поражений органов дыхания, глаз, мозга. Она характеризуется тяжёлым, длительным и рецидивирующим течением, полиморфизмом клинических проявлений, обусловленных миграцией личинок токсокар по различным органам и тканям. Заражение человека происходит при проглатывании инвазионных яиц токсокар.

Однако прямой контакт с псовыми не играет ведущей роли в заражении, поскольку выделяемые собаками яйца токсокар неинвазионны и нуждаются в созревании во внешней среде. Основную роль в передачи инвазии человеку играет загрязненная фекалиями инвазированных собак почва, в сельской местности – лесные ягоды, грибы. Возможна передача яиц токсокар с овощами и зеленью. Установлено, что в смывах с овощей, ягод и зелени с приусадебных участков яйца токсокар выявляются с частотой до 3 % от числа исследованных проб. Другими факторами передачи могут быть шерсть животных, загрязнённые продукты питания, вода, руки [1].

Эпидемиологически значимым является фактор загрязнения окружающей среды фекалиями собак, что приводит к значительной обсемененности почвы яйцами токсокар. В Астраханской области в 2004 г. яйца токсокар обнаружены в 6,6 % проб, в 2008 – 10,8 %. В Ростовской области интенсивность контаминации почвы яйцами данного возбудителя находилась в пределах от 1,2 до 16,67 экз. на 1 кг почвы. Показатели жизнеспособности яиц варьировали от 20 % до 84 % [3,5].

Большинство заражений, вызываемой *Toxocara* sp., происходит у маленьких детей от 1 до 4 лет, которые легко заражаются по методу «грязных рук», т.к. могут употребить в пищу то, что лежит на земле. Тем не менее среди гельминтозов токсокароз занимает второе место по частоте заражения людей в развитых странах [7].

После обнаружения личинок *Toxocara canis* у детей зарубежными учеными был изучен жизненный цикл возбудителя и миграция инвазионных личинок [6,8,13,14,15]. Эксперименты в основном ограничивались исследованием миграции личинок токсокар у грызунов и у высших млекопитающих, и есть лишь несколько сообщений о проведении подобных опытов у птиц и беспозвоночных хозяев [11,12].

В 2004 года в Бостоне, штате Массачусетс, в США описан случай заражения токсокарозом 16-ти летней девушки, непосредственно через дождевого червя (девушка его употребила в пищу), хотя авторы в качестве причины заражения указывали на землю, которая находилась на поверхности червя, не отрицая возможности заражения непосредственно через дождевого червя. Этот случай доказывает важную роль участия дождевых червей в распространении токсокароза [7].

Актуальность проведённых нами исследований состоит в том, что сведения о дождевых червях в роли паратенических (резервуарных) хозяев недостаточны, вопрос до сих пор является дискуссионным. В мировой практике вопрос участия дождевых червей в распространении токсокароза остаётся малоизученным, имеются лишь некоторые данные о проведении опытов с дождевыми червями видов *Eisenia fetida* и *Pheretima posthuma* [11,12].

**Цель исследования** – провести опыт по экспериментальному заражению дождевых червей *Eisenia fetida* инвазионными яйцами *Toxocara canis*. Установить период нахождения личинок в кожно-мышечном мешке и кишечнике дождевых червей.

**Материал и методы.** Яйца были получены путем вскрытия оплодотворённых самок нематод *T. canis*, которые были собраны после дегельминтизации месячных щенков немецкой овчарки. Яйца инкубировали в 0,5% р-ре формалина при температуре  $28 \pm 1$  °С в термостате в течение 4 недель.

После культивации яиц до инвазионной стадии перед заражением ставили биопробу на грызунах (восприимчивых хозяевах). Заражение проводили естественным скармливанием 50 инвазионных яиц *Toxocara canis* лабораторным мышам. На третий день после заражения личинки были обнаружены в печени, остальные личинки были обнаружены методом переваривания в искусственном желудочном соке [9]. Личинки были идентифицированы по методу Nichols [10] и Sprent [13].

Дождевых червей (*Eisenia fetida*) содержали в пластиковых цилиндрах, заполненных почвенным гумусом, глубиной 10 см, при комнатной температуре. Перед началом эксперимента случайным образом были выбраны 10 дождевых червей и исследованы методом трихинеллоскопии для обнаружения личинок токсокар, приобретённых в естественных условиях.

80 дождевых червей, приблизительно равных по размеру, были разделены на две группы: 60 (группа 1) и 20 (группа 2 – контрольная) и помещены в отдельные пластиковые цилиндры, заполненные 150 г почвы. Почву для заражения обсеменили 10000 инвазионных яиц *T. canis* и тщательно перемешали смесь, затем добавили в неё дождевых червей из группы 1 и содержали их в этой почве 4 дня при комнатной температуре. Червей из группы 2 содержали в качестве контрольной группы с не обсемененной почвой. Через 40 дней из группы 1 было выбрано 20 червей и вновь посажено в инвазионную почву для повторного заражения. После заражения естественным путём инвазионными яйцами (через обсеменённую почву) на 5-й день дождевых червей переместили в чистую почву (предварительно обмыв их, чтобы предотвратить дальнейший контакт с яйцами).

Миграцию и распространение личинок *Toxocara canis* исследовали в тканях дождевых червей, начиная с 5-го дня опыта (1-й день опыта содержания червей в чистой почве). Извлекали по 2–3 червя, фиксировали в 1 % формалине, и проводили их исследование путём вскрытия. После вскрытия червей кожно-мышечный мешок разделяли визуально на три части: передний, средний и задний отделы, подсчитывали количество личинок в каждой части. Кишечник отделяли и просматривали отдельно, также визуально разделяя его на три отдела. В течение 43 дней (с момента помещения в чистую почву) проводили вскрытие червей и просматривали их в компрессориях для трихинеллоскопа МИС-7 под микроскопом Микромед 3 вар. 3–20 для регистрации личинок в передней, средней и задней части кожно-мышечного мешка червя или кишечника.

**Результаты исследования.** В контрольной группе дождевых червей на протяжении всего опыта личинок не обнаружено. В опытной группе личинки *Toxocara canis*, вышедшие из яиц, регистрировались как в кожно-мышечном мешке, так и в кишечнике. Все личинки, попавшие в червей, вышли из яйцевых оболочек. В почве, которую выделяли черви в процессе их вскрытия, были обнаружены лишь оболочки от яиц. В дальнейшем часть личинок внедрялась через кишечник в кожно-мышечный мешок, где оставались жизнеспособными и подвижными в течение длительного времени. Личинки обнаруживались как в кожно-мышечном мешке, так и в кишечнике.

В первые дни исследования личинок преимущественно находили в передней и средней части кожно-мышечного мешка и кишечника. Интенсивность заражения червей личинками *Toxocara canis* была невысокой. Наибольшая интенсивность заражения отмечена в первую неделю после помещения червей в чистую почву (8). Наибольшее количество личинок, зарегистрированных в кожно-мышечном мешке червя, равно 7. Чаще личинки локализовались в средней части кожно-мышечного мешка, реже в передней. С 13 дня от

начала опыта личинки в передней части кожно-мышечного мешка не регистрировались. Максимальное их количество в этой части мускулатуры – 2, чаще 1 личинка ( $1,17 \pm 0,17$ ).

В средней части кожно-мышечного мешка личинки регистрировались чаще и в большем количестве: максимум 5, минимум – 1, в среднем  $2,44 \pm 0,58$ . Живые личинки регистрировались в первые две недели, в последующем, как погибшие, так и живые. В задней части кожно-мышечного мешка личинки также наблюдались. Живая личинка была отмечена на 29 день от начала опыта. Две неподвижные личинки в средней части кожно-мышечного мешка зарегистрированы на 37 день.

Живые личинки *Toxocara canis* выявлялись нами и в кишечнике. В передней части кишечника личинки отсутствовали. Наибольшее их количество регистрировалось в средней части кишечника от 1 до 6 ( $2,6 \pm 0,6$ ). В задней части личинок было меньше, чем в средней, но они сохранялись в этом отделе самое продолжительное время. Они были подвижными и регистрировались в кишечнике до 31 дня (хотя освобождение кишечника от пищи у дождевых червей происходит в течение трех суток). Среднее количество личинок, зарегистрированных по ходу опыта, отражено на рисунке 1.

Личинки перестали регистрироваться с 38 дня от начала опыта. Среднее количество личинок сокращалось на протяжении опыта: с 1 по 15 день опыта -  $4,01 \pm 0,63$ , а с 16 по 47 –  $1,0 \pm 0,3$ . С 16 дня опыта количество личинок в дождевых червях резко сократилось по сравнению с первыми днями заражения, но они обнаруживались и находились в подвижном состоянии в 50 % исследованных червей, в основном в кожно-мышечном мешке.

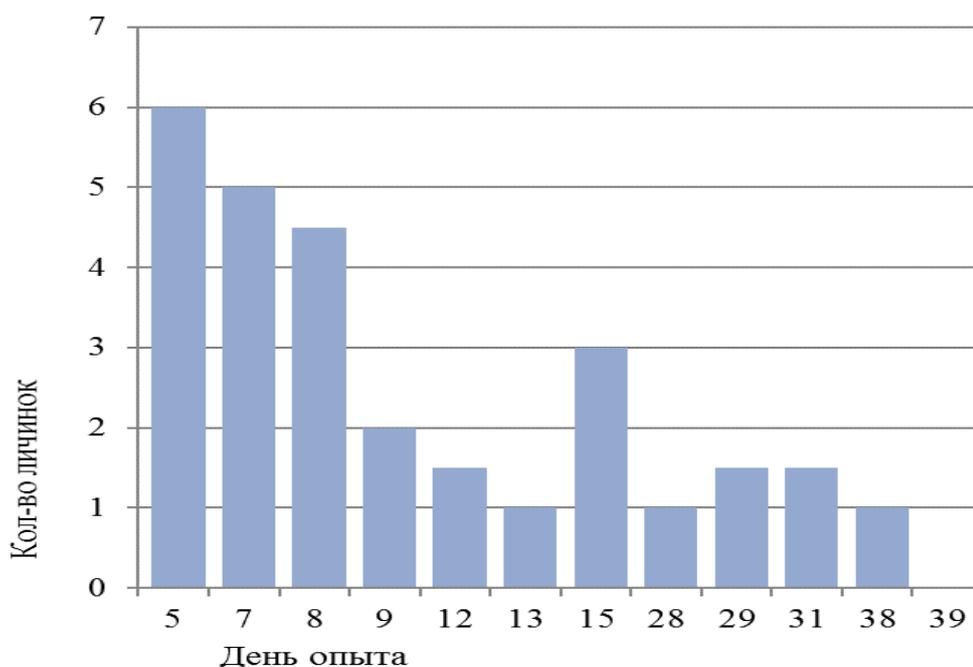


Рис.1. Среднее количество личинок *T. canis* в дождевом черве

Опыты с дождевыми червями были проведены японскими исследователями S.Okoshi и M. Usui в 1968 году и индийскими учёными Т.К.Pahari, N.K. Sasmal в 1991 году [11, 12]. Okoshi и Usui проводили опыты на дождевых червях *Eisenia fetida*, чтобы подтвердить восприимчивость грызунов и кур к заражению их личинками токсокар через дождевых червей. О продолжительности сохранения живых личинок в дождевых червях в их работе не упоминается [11]. Т.К.Pahari, N.K. Sasmal проводили исследование на другом виде дождевых червей – *Pheretima posthuma*. Они изучали период времени нахождения личинок в дождевых червях: на 15–20-й день и далее личинок в червях они не находили [12].

Результаты наших исследований преимущественно совпадают с данными зарубежных учёных, т.к. дождевые черви действительно заражаются инвазионными яйцами *T. canis*, но период нахождения живых личинок зависит от вида дождевых червей и других факторов. Как следует из наших опытов, личинок *Toxocara canis* мы находили в кожно-мышечном мешке на 37 день опыта, в контрольной группе дождевых червей личинок обнаружено не было ни в кишечнике, ни в кожно-мышечном мешке.

При повторном заражении дождевых червей инвазионными яйцами токсокар, резко снизилось проникновение личинок в кожно-мышечный мешок. Опыт длился 48 дней. Лишь у трех червей зарегистрировано в мускулатуре по 1-й личинке (за весь период опыта). Попавшие с почвой личинки оставались в кишечнике. На 48 день от начала повторного опыта в кишечнике находили до 24 живых и подвижных личинок *T.canis*. Среднее количество личинок в кишечнике составило  $10,2 \pm 1,85$  (6-24), что превосходит среднее количество личинок при первоначальном заражении. По-видимому, проникнув в кожно-мышечный мешок, личинка через некоторое время погибает, поэтому общее количество их к концу опыта уменьшается. Мы находили погибших личинок в кожно-мышечном мешке при первом опыте. Этот факт объясняет исчезновение личинок в кожно-мышечном мешке.

При повторном заражении можно говорить о приобретении дождевым червем определенного иммунитета к проникновению инвазионных личинок *T.canis* в кожно-мышечный мешок. При повторном заражении гибель личинок наблюдалась только в кожно-мышечном мешке в единичных случаях. В кишечнике, по-видимому, личинки остаются жизнеспособными в течение длительного времени. Дождевые черви *Eisenia fetida* некоторый период времени (в нашем случае 48 дней и более) могут служить источником заражения для собак и других паразитических хозяев, что подтверждается данными японских ученых Okoshi и Usui, которые успешно заражали личинками *T. canis*, полученными от дождевых червей, мышей и кур [11].

**Выводы.** Дождевые черви *Eisenia fetida* способны заражаться инвазионными яйцами *T.canis*, заглатывая почву, обсемененную яйцами токсокар. Наименьшее количество личинок

обнаружено в передней части кишечника и кожно-мышечного мешка дождевых червей ( $1,17 \pm 0,17$ ), наибольшее – в средней части кожно-мышечного мешка ( $2,44 \pm 0,58$ ) и кишечника ( $2,6 \pm 0,6$ ). Среднее количество личинок *T.canis* в дождевом черве было максимальным до 15 дня опыта –  $4,01 \pm 0,63$ , в последующем снизилось до  $1,0 \pm 0,3$ . С 38-го дня опыта личинки не регистрировались.

При повторном заражении дождевых червей *Eisenia fetida* инвазионными яйцами *T.canis* у червей вырабатывается иммунитет, и личинки, при заглатывании заражённой почвы, проникают в кишечник дождевого червя, но внедрения в кожно-мышечный мешок в дальнейшем практически не происходит. При этом количество личинок в кишечнике на протяжении опыта оставалось постоянным. Среднее количество личинок в кишечнике составило  $10,2 \pm 1,85$  (6–24), что превосходит среднее количество личинок при первоначальном заражении. Таким образом, дождевые черви могут выступать в качестве паратенических или транспортных хозяев в какой-то промежуток времени для птиц, грызунов и даже человека, которые, употребляя червей, могут заразиться.

### Список литературы

1. Лысенко А. Я., Константинова Т. Н., Авдюхина Т. И. Токсокароз: Учебное пособие. Российская медицинская академия последиplomного образования. М., 2004. – 40 с.
2. О заболеваемости геогельминтозами в Российской Федерации в 2013 году. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 29 сентября 2014 г. N 01/11370-14-27. – <http://www.consultant.ru> от 09.04.2015.
3. Постнова В. Ф., Шендо Г. Л., Джаркенов А. Ф., Базельцева Л. И., Постнов А. Б., Окунская Е. И. Оценка эпидемиологической значимости почвы при токсокарозе // Теория и практика борьбы с паразит. болез.: матер. докл. науч. конф. М., 2009. – Вып. 10. – С. 304–306.
4. Сергиев В.П., Успенский А.В., Романенко Н.А. и др. Новые и возвращающиеся гельминтозы как потенциальный фактор социально-эпидемических осложнений в России // Медицинская паразитология. – 2005. – № 4. – С. 6-8.
5. Шишканова Л. В., Васерин Ю. И., Хроменкова Е. П., Димидова Л. Л., Упырев А. В., Твердохлебова Т. И., Пригодин А. В. Обсемененность почвы яйцами гельминтов в Ростовской области // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: матер. докл. науч. конф. – М., 2009. – Вып 10. – С. 439-441.
6. Beaver, P.C. Larva migrans // Exp. Parasitol., 1956. – 5: 587-621.

7. Cianferoni A., Schneider L., Schantz P.M., Brown D., Fox L.M. Visceral larva migrans associated with earthworm ingestion: clinic evolution in an adolescent patient // *Pediatrics*, 2006. – 117: 336-339.
8. Done, J.T., Richardson, M.D. and Gibson, T.E. Experimental visceral larva migrans in the pig // *Res. Vet. Sci.*, 1960. – 1: 133-151.
9. Galvin, T.J. Experimental *Toxocara canis* infections in chickens and pigeons // *J. Parasitol.*, 1964. – 50: 124-127.
10. Nichols, R.L. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae // *J. Parasitol.*, 1956. – 42: 349-362.
11. Okoshi, S. and Usui, M., Experimental studies on *Toxascaris leonina*. Experimental infection of mice, chickens and earthworms with *Toxascaris leonina*, *Toxocara canis* and *Toxocara cati* // *Jpn. J. Vet. Sci.*, 1968. – 30: 151-166.
12. Pahari, T.K. and Sasmal, N.K. Experimental infection of Japanese quail with *Toxocara canis* larvae through earthworms // *Vet Parasitol.*, 1991. – 99: 337-340.
13. Sprent, J.F.A., On the invasion of the central nervous system by nematodes II. Invasion of the nervous system in Ascariasis // *Parasitology*, 1955. – 45: 41-55.
14. Sprent J. F. A. Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog // *J. Parasitol.*, 1958. – 48. – N 3: 184–209.
15. Tomimura, T., Yokota, M. and Takiguchi, H. Experimental visceral larva migrans in monkeys. Clinical, haematological, biochemical and gross pathological observations on monkeys inoculated with embryonated eggs of the dog ascarid, *Toxocara canis* // *Jpn. J. Vet. Sci.* 1976, 38: 533-548.

**Рецензенты:**

Козлов В.М., д.б.н., профессор кафедры охотоведения и биологии диких животных ФГБОУ ВПО «ВГСХА», г. Киров;

Заболотских Ю.С., д.б.н., профессор кафедры охотоведения и биологии диких животных ФГБОУ ВПО «ВГСХА», г. Киров.