

Киян В.С.

Казахский агротехнический
университет им. С. Сейфуллина,
Казахстан, г. Астана

**Биохимические и иммунологи-
ческие свойства экскреторно-
секреторного антигена
*Opisthorchis felineus***

В статье приводятся данные по изучению активности, специфичности и иммуногенности экскреторно-секреторного антигена возбудителя *Opisthorchis felineus*. Приведена схема получения антигенного продукта, основанная на культивировании марит описторха *in vitro* в искусственной среде RPMI-1640 и дальнейшей очистке методом центрифугирования. Сравнительные эксперименты по детекции белковых компонентов антигена показывают преимущество метода окраски оксидом серебра над стандартным методом, основанном на использовании раствора Кумасси. Установлено, что в состав экскреторно-секреторного антигена входит до 21 белковой фракции. Использование антигена в непрямом варианте ИФА с сыворотками зараженных собак показало его высокую активность и возможность применения для выявления специфических антител против возбудителя описторхоза. Кроме того, использование указанного антигена для иммунизации лабораторных мышей и сирийских хомяков показало высокую иммунологическую активность антигена и способность вызывать иммунный ответ в организме лабораторных животных.

Ключевые слова: иммунология, *Opisthorchis felineus*, мариты, экскреторно-секреторный антиген, электрофорез, иммуногенность.

Kiyan V.S.

S. Seifullin Kazakh Agro Technical
University
Kazakhstan, Astana

**Biochemical and immunological
properties of excretory-secretory
antigen *Opisthorchis felineus***

The main component at statement of serological reactions is an antigen, which should have the necessary biochemical and immunological properties, high specificity and activity. The article presents data on the production of excretory-secretory antigens of the *Opisthorchis felineus* pathogen. Describes a scheme for obtaining an antigenic product which is obtained by culturing *Opisthorchis* pathogens *in vitro* in the RPMI-1640 synthetic medium and further purified by centrifugation. Comparable experiments for the detection of protein antigen components show advantage silver staining method over the standard method, which is based on using Coomassie solution. Considering this fact, by its author has been proven that in the excretory-secretory antigen includes up to 21 of the protein fraction. The article presents data on the study of activity, specificity and immunogenicity of excretory-secretory antigen. Using the antigen in indirect ELISA version with sera of infected dogs showed its high activity and the possibility of applying for the detection of specific antibodies against the opisthorchiasis pathogen. In addition, the use of said antigen for immunization of laboratory mice and Syrian hamsters showed high immunological activity of antigen and ability to induce an immune response in the organism of laboratory animals.

Key words: immunology, *Opisthorchis felineus*, a marita, excretory-secretory antigen, electrophoresis, immunogenicity.

Киян В.С.

С. Сейфуллин атындағы Қазақ
агротехникалық университеті
Қазақстан, Астана қ.

***Opisthorchis felineus*
экскреторлы-секреторлы
антигеннің биохимиялық және
иммунологиялық қасиеттері**

Мақалада *Opisthorchis felineus* экскреторлы-секреторлы антигенін алу бойынша мәліметтер енгізілген. *In vitro* жағдайында описторх мариталарын RPMI-1640 қоректік ортада культивирлеп, одан әрі тазартуын центрифугалау әдісімен жүзеге асырудың негізіндегі антигендік өнімді алу сызбасы көрсетілген. Антигеннің ақуыз компоненттерін анықтау үшін жасалынған салыстырмалы тәжірибелердің нәтижесінде Кумасси ерітіндісінде негізделген стандартты күміс оксидімен бояу әдісінің артықшылығы анықталған. Экскреторлы-секреторлы антигеннің құрамына 21 ақуыз фракциялары кіретіні анықталды. Жасалған эксперименттер мәліметтері бойынша алынған антигеннің құрамында ақуыздардың бар екендігі анықталды, сонымен қатар, иммунды ферменттік талдау реакциясында белсенділікке ие және оны описторозға қарсы түзілген телімді антиденелерді анықтауға мүмкіндік береді. Осымен қатар алынған мәліметтер бойынша, антиген иммуногенді белсенділікке ие және зертханалық жануарларда иммундық жауапты тудыра алатын қасиетке ие. Мақалада экскреторлы-секреторлы антигенінің белсенділігі, телімділігі, иммуногендігі бойынша мәлімет берілген.

Түйін сөздер: иммунология, *Opisthorchis felineus*, мариталар, экскреторлы-секреторлы антиген, электрофорез, иммуногенділік.

**БИОХИМИЧЕСКИЕ
И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА
ЭКСКРЕТОРНО-
СЕКРЕТОРНОГО
АНТИГЕНА *OPISTHORCHIS
FELINEUS***

Введение

Иммунология трематодных инфекций на данное время является одним из наименее изученных направлений, и литературные источники говорят лишь об ограниченных наблюдениях, а также содержат незначительные практические данные. Самый важный фактор затрудняющий изучение в данном направлении – это ограниченный доступ к экскреторным и белковым компонентам паразитов. Инфекционной формы возбудителя, необходимой для изучения иммунологических механизмов не всегда хватает. Кроме этого, определенные трудности наблюдаются в выращивании паразита *in vitro*, что также является важным препятствием для прогресса в этой области исследований. Иммунология инфекции *Opisthorchis* в значительной степени связана с серологией и иммунодиагностикой, где основными компонентами являются специфические антигены и иммуноглобулины [1].

В качестве антигенов для иммунодиагностики и количественного анализа иммунного ответа у зараженных хозяев используют различные компоненты паразитов. Они могут быть классифицированы как выделительный (экскреторно-секреторный) и соматический антигены [2-5].

Данные об антигенах *O. felineus* встречающиеся в литературных источниках, в значительной степени связаны с иммунодиагностикой. Были разработаны методы непрямой гемагглютинации, внутрикожного теста на основе использования неочищенного соматического экстракта взрослых червей [6, 7]. Сравнительный анализ этих методов показал, что ИФА является лучшим методом и полученные результаты коррелируют с интенсивностью течения инфекции. Тем не менее, авторами не было указано никакой информации о специфике данного теста. Другой пример отражает результаты исследований белкового состава в антигенах *O. felineus*, полученных из взрослых червей, экстрактов и яиц. Были охарактеризованы и обнаружены фракции с молекулярной массой 105, 74, 70 и 64 кДа, имеющих потенциал для иммунодиагностики [8, 9]. Встречаются данные по разработке специфических антител класса IgM к *O. felineus*, которые затем применены в диагностике острых инфекций [10].

Аналогичные или отличающиеся антигены находятся в разных стадиях развития паразита, начиная от личинок и до созревания взрослых особей. Соматические антигены, легко производимые, и их обычно получают в виде водных экстрактов из соответствующих стадий развития паразита, которые доступны в достаточном количестве, в то время как экскреторно-секреторный продукт паразита получают путем выращивания живых паразитов *in vitro* в небелковых культуральных средах [11, 12, 13]. Цель настоящей работы – отработка методики получения экскреторно-секреторного антигена *Opisthorchis felineus* и изучение его биохимических и иммунологических свойств.

Материалы и методы

При планировании и проведении экспериментов с участием лабораторных животных ориентировались на международные законы и правила, в которых отражены критерии гуманного обращения, содержания и кормления: Международные руководящие принципы для биомедицинских исследований с участием животных, 2012 г (*International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*); Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, 2005 г (*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and*

Other Scientific Purposes); Принципы эвтаназии для животных Американской Ветеринарной Медицинской Ассоциации, 2013 г (*American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals*). На проведение экспериментов с использованием лабораторных животных было получено разрешение Этической комиссии факультета Ветеринарии и технологии животноводства КазАТУ им. С.Сейфуллина, Протокол заседания №1 от 07.04.2015 г.

Половозрелые мариты *O. felineus* получали путем заражения золотых хомячков метатеркариями описторха, выделенных из рыб семейства карповых [14]. Через 80-90 дней после начала заражения, лабораторных животных усыпляли и извлекали печень для исследования на наличие половозрелых форм возбудителя описторхоза.

Для получения экскреторно-секреторного антигена (ЭСА) жизнеспособные мариты *O. felineus* тщательно отмывались от следов желчи и крови стерильным физиологическим раствором и по 100 экземпляров помещались в матрас с синтетической средой RPMI-1640 не содержащей белковые компоненты. Культивирование проводилось при 37°C и 5% содержании углекислого газа для накопления экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) возбудителя описторхоза. После 14-16 часов культивирования, проводили смену среды и дальнейшее культивирование в течение 5-6 суток для накопления максимальной концентрации ЭСП в питательной среде (рисунок 1).



Рисунок 1 – Схема получения экскреторно-секреторного антигена

После культивирования половозрелых марит *O. felineus* в условиях *in vitro*, проводили сбор культуральной среды, которую очищали от клеточного детрита с помощью центрифугирования в течение 10 минут при 15 000 оборотов в минуту. Измеряли концентрацию белка в полученной культуральной жидкости и использовали ее в качестве экскреторно-секреторного антигена.

Для детекции белков антигенного препарата проводили окраску двумя методами — раствором Кумасси и оксидом серебра. Электрофорез проводили в 4-15% градиентном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия на аппарате для вертикального электрофореза («BioRad», США). Для разделения образцов нами использовались коммерческие градиентные гели 4-12% («BioRad», США). Буфер для разведения образцов готовили следующим образом: к 950 мкл 4⁺ буферу («BioRad», США), добавляли 50 мкл меркаптоэтанола. Образцы разводили в соотношении 1:1, кипятили в течение 5 минут при 100°C и охлаждали. Электрофорез проводили при двух режимах: при напряжении 125 В (10 мин) и 200 В (30 мин). В качестве белкового стандарта использовали маркер молекулярной массы 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25 и 20 кДа («BioRad», США). Процесс окраски гелей раствором серебра осуществляли согласно инструкции по применению набора «SilverQuest Staining Kit» («Invitrogen», США). Анализ антигенов на наличие количественного состава осуществляли с использованием программного обеспечения *Photo-Capt Version 12.4* («Vilber Lourmat», Франция).

Иммунизация лабораторных животных. Для эксперимента использовались беспородные белые мыши одного пола, возрастом 1,5 – 2 месяцев, массой 12-14 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. Мышам в первый день иммунизации вводили внутривентриально по 100 мкг антигена в 0,1 мл полного адьюванта Фрейда («Sigma», США). На 7 день по 100 мкг антигена в 0,1 мл неполного адьюванта Фрейда. На 11, 12, 13 дни иммунизации животным инъецировали по 100 мкг антигена в забуференном физиологическом растворе, рН 7,2-7,4 [15]. Группа сирийских хомяков формировалась из животных одного пола, возрастом 2-2,5 месяцев, массой 100-120 г. Схема иммунизации хомяков аналогична схеме при работе с мышами. Особенностью является то, для хомяков количество вводимого антигена составляло 200 мкг на одно животное.

Активность полученного антигена определяли в непрямом варианте ИФА. Антиген сенсибилизировали в лунки планшета кон-центрацией 10 мкг/мл в объеме 100 мкл. Затем проводили блокирование свободных участков 1% раствором БСА, после чего проводили титрование сывороток, начиная с разведения 1:100. Сыворотки от зараженных животных, используемые для проверки активности экскреторно-секреторного антигена, были получены в предыдущих экспериментах по изучению возможности искусственного заражения собак возбудителем описторхоза в лабораторных условиях [16], негативом служила сыворотка здорового животного. В качестве конъюгата использовали антивидовые антитела меченные ферментом пероксидазой хрена (*Anti-dog IgG*).

Результаты и их обсуждение

Объем полученного экскреторно-секреторного антигена составил 100 мл, концентрация белка в антигене была равна 1 мг/мл. Данный антиген использовался для изучения белкового состава.

При окрашивании антигенного препарата с помощью раствора Кумасси, детекция белковых компонентов была затруднена из-за низкого разрешения и размытости рисунка (рисунок 2), хотя наблюдается большое количество белковых полос в изучаемых образцах.

Поэтому дальнейшие наши эксперименты включали концентрирование имеющихся антигенов методом выпаривания и использования для окраски коммерческих наборов с высокой чувствительностью, основанных на окраске белков раствором оксида серебра.

Результаты подробного количественного белкового состава антигена, полученного в этом эксперименте, представлены на рисунке 3.

Результат, представленный на рисунке 3, позволяет более детально изучить количественный белковый состав антигена, что говорит о лучшей чувствительности данного метода окраски, по сравнению с другими методами. Так, в составе экскреторно-секреторного антигена нами был детектирован 21 мажорный белок с молекулярной массой 283, 262, 248, 237, 220, 212, 178, 119, 73, 67, 63, 55, 53, 51, 47, 46, 38, 30, 28, 27 и 25 кДа. При этом концентрация указанных белков была различной, что отчетливо видно на рисунке 3 по интенсивности окраски белковых полос.

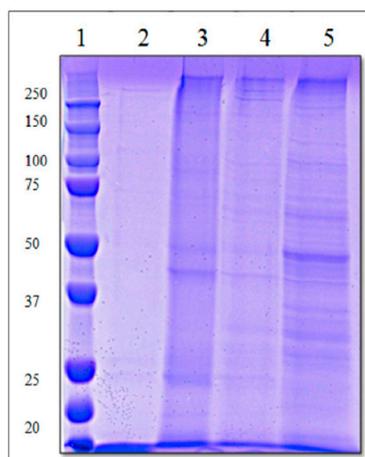


Рисунок 2 – Результаты электрофоретического разделения антигенных препаратов в 4-15% градиентном ПААГ и окраски раствором Кумасси: 1 – маркер (кДа), 2- ЭСП, 3 – 1 фракция СА, 4 – 2 фракция СА, 5 – яичный антиген

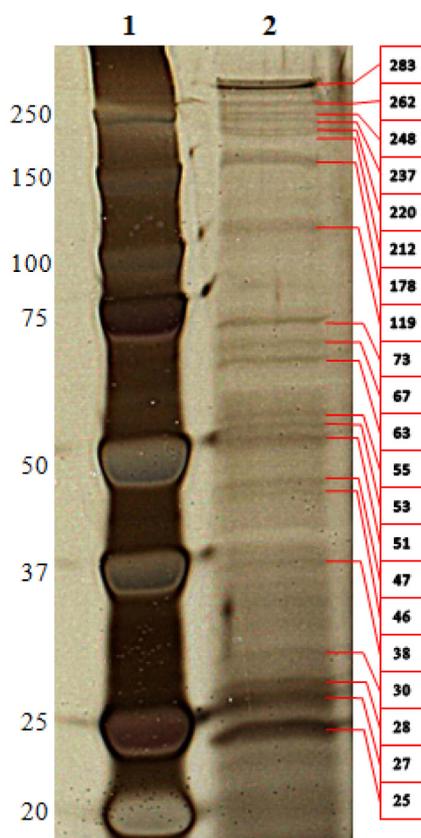


Рисунок 3 – Результаты электрофоретического разделения ЭСА: 1 – белковый маркер, 2 – экскреторно-секреторный антиген

Активность полученного антигена была в прямом варианте ИФА и показала довольно вы-

сокие показатели при использовании специфических сывороток (рисунок 4).

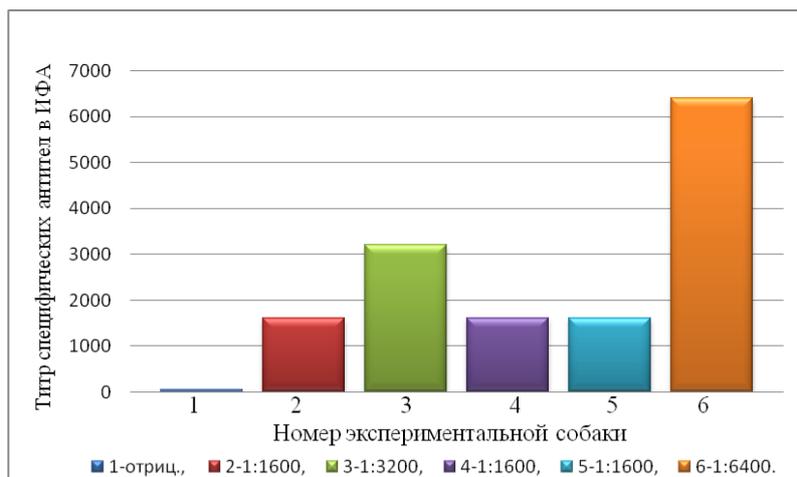


Рисунок 4 – Активность экскреторно-секреторного антигена в непрямом ИФА

Из рисунка 4 видно, что полученный экскреторно-секреторный антиген обладает довольно хорошей активностью и специфичностью. При использовании позитивных сывороток, средний титр составил $1:2400 \pm 0,78$. Негативная сыворотка показала отрицательный результат. Эти данные позволяют использовать ЭСА при определении специфических антител против возбудителя описторхоза, а сыворотки зараженных собак – для детекции и

идентификации иммуногенных белков, входящих в состав ЭСА. Иммуногенность экскреторно-секреторного антигена была проверена путем иммунизации лабораторных животных, среди которых беспородные лабораторные мыши и сирийские хомячки. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку не иммунизированного животного. Результаты иммунизации лабораторных животных и титры антител представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты тестирования сыворотки лабораторных животных, иммунизированных ЭСА

№ п/п	Показатели титров антител	
	Беспородные лабораторные мыши	Сирийские хомячки
1	1:3200	1:6400
2	1:200	1:6400
3	1:200	1:3200
4	1:1600	1:800
5	1:200	1:400
6 (К-)	-	-
В среднем	$1080 \pm 0,84$	$3440 \pm 0,76$

Данные таблицы 1 показывают, что полученный экскреторно-секреторный антиген обладает достаточной иммуногенностью, чтобы вызывать образование специфических антител. Стоит отметить, что титры иммунизированных сирийских хомячков были в пределах 1:400-1:6400, что намного выше ти-

тров иммунизированных мышей, которые находились в пределах 1:200-1:3200. Эти данные указывают на способность компонентов, входящих в состав данного экскреторно-секреторного антигена вызывать специфический иммунитет в организме хозяина, в котором идет паразитирование описторхов.

Таким образом, в результате проделанной работы можно сделать вывод, что полученный по указанной схеме экскреторно-секреторный антиген в своем составе имеет более 21 белковой фракции, обладает иммуногенными свойствами и может служить в качестве антигенного

материала при детекции специфических антител к возбудителю *O. felineus*.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках научного проекта №0115RK00487 на 2015-2017 гг.

Литература

- 1 Wongratanacheewin S., Sermswan R.W., Sirisinha S. Immunology and molecular biology of *Opisthorchis viverrini* infection // *Acta Trop.* – 2003. – Vol. 88(3). – P. 195-207. DOI:10.1016/j.actatropica.2003.02.002
- 2 Sun T., Gibson J.B. Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infections // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1969. – Vol. 18. – P. 241-252.
- 3 Sun T., Gibson J.B. Metabolic products of adult *Clonorchis sinensis*: their composition and antigenic potential // *J. Helminthol.* – 1969. – Vol. 43. P. 395-402.
- 4 Kojima S., Yokogawa M., Tada T. Production and properties of reaginic antibodies in rabbits infected with *Clonorchis sinensis* or *Schistosoma japonicum* // *Exp. Parasitol.* – 1974. – Vol. 35. – P. 141-149.
- 5 Chen C.Y., Hsieh W.C., Shih H.H., Chen S.N. Immunodiagnosis of clonorchiasis by enzyme-linked immunosorbent assay // *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.* – 1988. – Vol. 19. – P. 117-121.
- 6 Klebanovskaia I.A. Indirect hemagglutination reaction in the diagnosis of the early phase of opisthorchiasis. I. A method of isolating erythrocyte samples and the results of their diagnostic use in experimental opisthorchiasis in golden hamsters // *Med. Parazitol. (Mosk.)*. – 1981. – Vol. 50. – P. 20-23.
- 7 Klebanovskaia I.A. Indirect hemagglutination reaction in the diagnosis of the early phase of opisthorchiasis. 3. An economic method of obtaining a dried, erythrocyte opisthorchid antigenic diagnostic agent // *Med. Parazitol. (Mosk.)*. – 1985. – Vol. 54. – P. 25-27.
- 8 Glupov V.V., Khokhlova N.I., Khvoshchevskaia M.F., Vodianskaia S.N., Iurlova, N.I. The use of immunoblotting for studying *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) antigens // *Med. Parazitol. (Mosk.)*. – 1997. – Vol. 66. – P. 17-19.
- 9 Kotelkin A.T., Razumov I.A., Pokrovskii I.V., Loktev V.B. A comparative study of the somatic, excretory-secretory and egg antigens of *Opisthorchis felineus* // *Med. Parazitol. (Mosk.)*. – 1997. – Vol. 66. – P. 12-16.
- 10 Meniavtseva T.A., Ratner G.M., Struchkova S.V., Kolmakova M.V., Stepanova T.F., Lepekhn A.V., Maier V.A., Postnikova T.F. Immunoenzyme analysis in the diagnosis of opisthorchiasis. I. The development of an immunoenzyme method for determining IgM antibodies to the *Opisthorchis* antigen // *Med. Parazitol. (Mosk.)*. – 1996. – Vol. 65. – P. 41-43.
- 11 Wongratanacheewin S., Sirisinha S. Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens: physicochemical characterization and antigen localization // *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.* – 1987. – Vol. 18. – P. 511-520.
- 12 Wongratanacheewin S., Chawengkirttikul R., Bunnag D., Sirisinha S. Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis // *Parasitology.* – 1988. – Vol. 96. – P. 119-128.
- 13 Боровиков С.Н., Куйбагаров М.А., Сураншиев Ж.А., Баешева Д.А., Атыгаева С.К., Халикова А.С. Получение и изучение иммунохимических свойств антигенов описторхов // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2010. – №4. – С. 70-74.
- 14 Lvova M.N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Sripa B. Comparative histopathology of *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke // *Parasitol Int.* – 2012. – Vol. 61(1). – P. 167-172. DOI: 10.1016/j.parint.2011.08.005.
- 15 Фридлянская И.И. Получение поликлональных антител // *Методы культивирования клеток: Сб. науч. трудов, Л.: Наука.* – 1988. – С. 194-205.
- 16 Киян В.С., Токпан С.С., Байболин Ж.К., Тетерин А.В., Мергасов А.Г. Гематологические показатели собак при искусственном заражении описторхозом // *Вестник ПГУ. Серия Химико-биологическая, Павлодар.* – 2015. – №3. – С. 12-20.

References

- 1 Wongratanacheewin S, Sermswan RW, Sirisinha S (2003) Immunology and molecular biology of *Opisthorchis viverrini* infection, *Acta Trop*, 88:195-207. DOI:10.1016/j.actatropica.2003.02.002
- 2 Sun T, Gibson JB (1969) Antigens of *Clonorchis sinensis* in experimental and human infections, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18:241-252.
- 3 Sun T, Gibson JB (1969) Metabolic products of adult *Clonorchis sinensis*: their composition and antigenic potential, *J. Helminthol.*, 43:395-402.
- 4 Kojima S, Yokogawa M, Tada T (1974) Production and properties of reaginic antibodies in rabbits infected with *Clonorchis sinensis* or *Schistosoma japonicum*, *Exp. Parasitol.*, 35:141-149.
- 5 Chen CY, Hsieh WC, Shih HH, Chen SN (1988) Immunodiagnosis of clonorchiasis by enzyme-linked immunosorbent assay, *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.*, 19:117-121.
- 6 Klebanovskaia I.A. (1981) Indirect hemagglutination reaction in the diagnosis of the early phase of opisthorchiasis. I. A method of isolating erythrocyte samples and the results of their diagnostic use in experimental opisthorchiasis in golden hamsters, *Med. Parazitol. (Mosk.)*, 50:20-23.

- 7 Klebanovskaia IA (1985) Indirect hemagglutination reaction in the diagnosis of the early phase of opisthorchiasis. 3. An economic method of obtaining a dried, erythrocyte opisthorchid antigenic diagnostic agent, *Med. Parazitol. (Mosk.)*, 54:25-27.
- 8 Glupov VV, Khokhlova NI, Khvoshchevskaia MF, Vodianskaia SN, Iurlova NI (1997) The use of immunoblotting for studying *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) antigens, *Med. Parazitol. (Mosk.)*, 66:17-19.
- 9 Kotelkin AT, Razumov IA, Pokrovskii IV, Loktev VB (1997) A comparative study of the somatic, excretory-secretory and egg antigens of *Opisthorchis felinus*, *Med. Parazitol. (Mosk.)*, 66:12-16.
- 10 Meniavtseva TA, Ratner GM, Struchkova SV, Kolmakova MV, Stepanova TE, Lepekhn AV, Maier VA, Postnikova TF (1996) Immunoenzyme analysis in the diagnosis of opisthorchiasis. I. The development of an immunoenzyme method for determining IgM antibodies to the *Opisthorchis* antigen, *Med. Parazitol. (Mosk.)*, 65:41-43.
- 11 Wongratanacheewin S, Sirisinha S (1987) Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens: physicochemical characterization and antigen localization, *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health.*, 18:511-520.
- 12 Wongratanacheewin S, Chawengkirttikul R, Bunnag D, Sirisinha S (1988) Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis, *Parasitology*, 96:119-128.
- 13 Borovikov SN, Kuibagarov MA, Suranshiev ZhA, Baesheva DA, Atygaeva SK, Khalikova AS (2010) Preparation and study immunochemical properties of the opisthorchis antigens [Poluchenie i izuchenie immunokhimicheskikh svoystv antigenov opistorkhov], *Biothechnology. Theory and practice*, 4:70-74. (In Russian)
- 14 Lvova MN, Tangkawattana S, Balthaisong S, Katokhin AV, Mordvinov VA, Spira B (2012) Comparative histopathology of *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke, *Parasitol Int.*, 61:167-172. DOI: 10.1016/j.parint.2011.08.005.
- 15 Fridlianskaia II (1988) Preparation the polyclonal antibody. Cell culture techniques [Poluchenie poliklonal'nykh antitel. Metody kul'tivirovaniia kletok], *Bullet of scientific papers, Nauka, Leningrad*, 194-205. (In Russian)
- 16 Kiyani VS, Tokpan SS, Baibolin ZhK, Teterin AV, Mertasov AG (2015) Hematologic indicators of the dogs under artificial infection by opisthorchiasis [Gematologicheskie pokazateli sobak pri iskusstvennom zarazhenii opistorkhozom], *Bulletin of PSU. A series of chemical and biological, Pavlodar*, 3:12-20. (In Russian)