

ОБНАРУЖЕНИЕ В ЖЕЛЧИ
СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА *FASCIOLA HEPATICA* —
ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ФАСЦИОЛЕЗА

В. В. Клименко

Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени институт гельминтологии
имени академика К. И. Скрябина, Москва

В желчи разных видов животных с экспериментальным и естественным фасциолезом обнаружены секретлируемые паразитами антигены, один из которых оказался идентичным с очищенным соматическим белковым антигеном (молекулярный вес — 27 500), полученным из экстракта *F. hepatica*. Обнаружение этого антигена в желчи может служить диагностическим признаком особенно в тех случаях, когда овоскопические или основанные на обнаружении антител иммунологические методы неэффективны.

Иммунологическая диагностика инфекционных и паразитарных заболеваний основана либо на обнаружении специфических антител в больном организме, либо, наоборот, на обнаружении антигенов возбудителя. В гельминтологии широко используется первый подход; попытки обнаружения паразитарных антигенов предпринимались лишь в отдельных случаях главным образом при шистосомозах (Berggren, Weller, 1967; Gold e. a., 1969; Bawden, Weller, 1974; Nash e. a., 1974; Carlier e. a., 1975).

Локализация фасциол в печени хозяина позволяет предположить наличие секреторных антигенов паразита в окружающей среде, в частности в желчи. Однако имеется сообщение об отрицательных результатах исследования желчи зараженных животных на наличие антигенов фасциол (Tailliez, Kogach, 1970). По другим данным, при экспериментальном фасциолезе в желчи овец обнаружено несколько антигенных компонентов (Movsesijan, Vorojević, 1973). Диагностическая значимость этого факта авторами не обсуждается. Они лишь рекомендуют желчь как один из источников получения антигена для его последующего использования в иммунодиагностических тестах, основанных на обнаружении антител. Один из найденных в желчи антигенов, по данным авторов, оказался иммунологически идентичным с антигеном, выделенным из экстракта фасциол или их секреторно-эксреторных продуктов. Этот антигенный компонент по иммунологической характеристике и поведению при фракционировании экстракта фасциол на сефадексе сходен с очищенным нами соматическим белковым антигеном *F. hepatica* с молекулярным весом 27 500, перспективным в иммунодиагностике (Клименко, 1971, 1971а). Последний обнаружен нами и в секреторно-эксреторных продуктах фасциол после инкубации живых паразитов в солевом растворе (Клименко, 1977).

Целесообразно было получить экспериментальное подтверждение присутствия данного антигена в желчи зараженных животных, что могло бы быть новым диагностическим подходом при фасциолезе. Краткое сообщение о положительных результатах этой работы было сделано ранее (Клименко, 1977а). Здесь представлено подробное изложение проведенных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали желчь экспериментально и естественно инвазированных *F. hepatica* животных, полученную после убоя и вскрытия желчного пузыря. Для удаления яиц гельминтов и прочих примесей желчь центрифугировали при 5000 об./мин в течение 10 мин.

Антигенную активность супернатанта исследовали методом иммунодиффузии в агаровом геле (Гусев, 1968) с последующим окрашиванием высушенных агаровых пластин 1%-ным раствором амидошварца в 7%-ной уксусной кислоте.

Для постановки реакции использовали иммунные сыворотки кроликов и овец (5—6 мес. после заражения *F. hepatica*), содержавшие антитела против белковых антигенов фасциол, а также сыворотки овец и крыс, полученные соответственно через 6 и 2 недели после заражения и содержавшие антитела против антигенов, растворимых в трихлоруксусной кислоте. В качестве контроля использовали желчь и сыворотки незараженных животных, а также сыворотки животных с другими гельминтозами.

Идентификацию антигенов желчи проводили с помощью полученных по ранее описанной методике различных соматических антигенов *F. hepatica* (Клименко, 1971, 1977а). Использовали неочищенные белковые экстракты и растворимые в трихлоруксусной кислоте фракции экстракта, а также фракции, полученные методом гель-хроматографии на сефадексе Г-100, в том числе фракцию с $K_{av}=0.4$, соответствующую пику активности белкового антигена с молекулярным весом 27 500. Кроме того, были использованы секреторно-эксcretорные антигены *F. hepatica*, получение которых описано (Клименко, 1977).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В первых опытах было проведено исследование антигенной активности желчи крупного рогатого скота, собранной после убоя на мясокомбинате. Исследовали желчь 16 животных без признаков патологии печени и желчь 8 животных, у которых в желчных протоках были обнаружены *F. hepatica*, причем только у одного из них (№ 12) была высокая интенсивность инвазии, остальные (№ 13—19) были заражены слабо (см. таблицу).

Исследовали также желчь 6 кроликов, 4 овец и 1 быка, экспериментально зараженных *F. hepatica*, с продолжительностью инвазии 4—6 мес. после заражения. У одной из овец (№ 10), получившей такую же дозу адолескариев, как и остальные, после убоя ни фасциол, ни патологических изменений в печени не обнаружено, поэтому ее можно считать контролем. У остальных животных с экспериментальным фасцилезом наряду с патологическими изменениями в печени в желчных протоках обнаружены фасциолы, а в желчи — обилие яиц этих паразитов.

Как показано в таблице, в желчи незараженных животных методом иммунодиффузии антигены не обнаружены. В то же время в желчи всех животных с экспериментальным фасцилезом и животного с интенсивной естественной инвазией (№ 12) обнаружен антиген, оказавшийся иммунологически идентичным с соматическим белковым антигеном невысокого молекулярного веса (27 500), полученным из экстракта *F. hepatica*, и с антигеном, выделяемым фасциолами в среду инкубации *in vitro* (рис. 1, 2). Однако при слабой интенсивности инвазии (естественный фасцилез крупного рогатого скота) этот антиген в желчи обычно не удавалось обнаружить. Положительного результата в этих случаях можно было достигнуть путем предварительного сгущения желчи и особой постановки реакции, увеличивающей ее чувствительность (рис. 4, II, б).

Попытки обнаружения антигена в сыворотке крови и моче животных с интенсивной инвазией и высоким уровнем антигена в желчи дали отрицательные результаты.

При исследовании желчи на наличие антител также были получены отрицательные результаты: не было реакции между желчью зараженных

животных и антигенами фасциол (рис. 4, II, б). Антитела, соответствующие антигенам фасциол, были обнаружены только в сыворотке крови (рис. 1), причем титры антител, соответствующих обнаруженному в желчи антигену, иногда совпадали с титрами этого антигена, но в ряде случаев наблюдалась обратная зависимость. Так, у кролика № 6 при самой высокой интенсивности инвазии и самом высоком уровне антигена в желчи уровень анти-

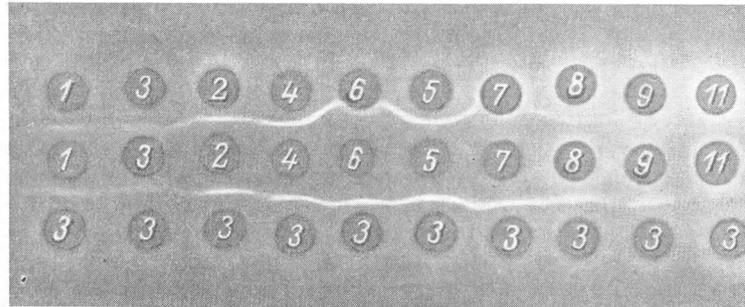


Рис. 1. Антигенная активность желчи при фасциозе.

Верхний ряд лунок: сыворотки кроликов (1—6), овец (7—9) и крупного рогатого скота (11), зараженных *F. hepatica*; средний ряд: желчь тех же животных; нижний ряд: сыворотка кролика № 3, зараженного *F. hepatica*.

тел в сыворотке оказался самым низким (рис. 3). Такое же соотношение антигена и антител имело место у всех зараженных овец (см. таблицу).

Сопоставление полученных показателей позволило установить определенную (не идеальную, но все же закономерную) зависимость между интенсивностью инвазии и уровнем антигена в желчи всех зараженных жи-

вотных, за исключением кролика № 3, у которого титр антигена в желчи был значительно ниже, чем при более слабом заражении (рис. 3). Интересно отметить, что уровень антител в сыворотке этого кролика был самым высоким.

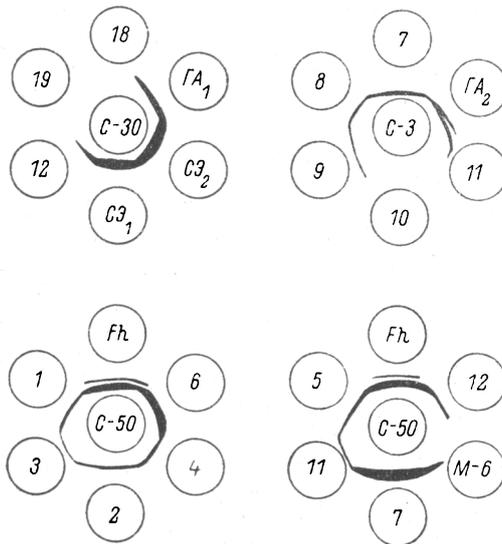


Рис. 2. Идентификация паразитарных антигенов в желчи животных, зараженных *F. hepatica*.

В центральных лунках: сыворотка кроликов (№ 3, 30, 50) с экспериментальным фасциозом; в периферических лунках: желчь кроликов (1—6), овец (7—10) и крупного рогатого скота (11—19), зараженных *F. hepatica*. М-6 — моча кролика № 6; GA₁, GA₂ — разные серии главного белкового антигена (молекулярный вес — 27 500), выделенного из экстракта *F. hepatica* методом гель-хроматографии на сефадексе; CA₁, CA₂ — секреторно-экскреторные продукты *hepatica*, полученные при инкубации живых паразитов *in vitro*.

Кроме упомянутого антигена, являющегося главным, в желчи животных с наиболее интенсивной инвазией выявлено еще по 1—2 слабо реагирующих антигена (см. таблицу, кролики № 5—6, овца № 7). Один из них идентичен с соматическим белковым антигеном высокого молекулярного веса, другие из-за слабости реакции идентифицировать не представлялось возможным.

Следует также отметить реакцию желчи овцы № 8 со сравнительно невысокой интенсивностью инвазии. Эта желчь, реагируя с сывороткой, полученной от той же овцы, образует довольно интенсивную полосу пре-

Интенсивность инвазии и уровень паразитарных антигенов в желчи и соответствующих антител в сыворотке крови при фасциолезе

Инвазия	Вид и № животного	Продолжительность инвазии (в мес)	Доза адолескарий при заражении	Число фасциол при вскрытии	Титр главного белкового антигена в желчи	Титр антител, соответствующих главному антигену (в сыворотке крови)	Число других антигенных компонентов желчи	Реакция желчи с образованием неокрашиваемого преципитата
Экспериментальный фасциолез	Кролики							
	1	5—6	50	4	4	8	—	—
	2		50	8	8	8	—	—
	3		50	9	2	16	—	—
	4		50	13	8	8	—	—
	5		50	20	8	8	1	—
	6		50	36	16	2	2	—
	Овцы							
	7	4—4.5	200	> 100	16	1	1	+
	8		200	30	8	1	1	+
9		200	50	8	1	—	+	
10		200	—	—	—	—	—	
Крупный рогатый скот	11	6	500	> 100	2	—	—	+
	12 ¹	?	?	> 90	4	Не исследовали	—	+
	13—19 ¹ 20—35 ²		?	5—16	—	»	—	+
			—	—	—	»	—	—
Естественный фасциолез								

¹ Половозрелые паразиты.

² Незараженные.

ципитации, хотя, как установлено, уровень антител, соответствующих главному антигену, в овечьих сыворотках недостаточен для получения такой реакции. Присутствие других паразитарных антигенов в желчи лимитировано даже при более высокой интенсивности инвазии. Следовательно, компонент желчи овцы № 8, реагирующий со «своей» сывороткой, имеет неизвестную природу.

Характеризуя все обнаруженные в желчи антигены, следует отметить, что преципитат, образуемый ими в геле, хорошо окрашивался амидошварцем.

Кроме реакции, обусловленной перечисленными антигенами, наблюдалась независимо от интенсивности инвазии реакция между иммунными сыворотками и желчью овец и крупного рогатого скота с образованием полосы преципитации, неокрашиваемой амидошварцем. Подобной реакции не было с желчью зараженных кроликов. Более того, желчь кроликов способствовала частичному растворению преципитата, образуемого помещенной рядом желчью овец или крупного рогатого скота (рис. 4, I, a). При слабой интенсивности инвазии, когда в желчи не удавалось обнаружить даже главный антигенный компонент, неокрашиваемая полоса оказывалась в этих случаях единственной (рис. 4). Желчь крупного и мелкого рогатого скота со здоровой печенью не давала неокрашиваемой полосы преципитации. Однако после длительного хранения в замороженном состоянии эта желчь начинала реагировать так же, как и желчь слабо зараженных животных. Следует особенно отметить, что желчь зараженного скота давала неокрашиваемую полосу не только с гомологичными (анти-*F. hepatica*) сыворотками, но и с сыворотками

животных с экспериментальным дикроцелиозом и диктиокаулезом и даже с сыворотками незараженных крыс.

Подобная реакция имела место при исследовании 5 образцов желчи людей с патологией печени неясной этиологии, однако ни в одном случае

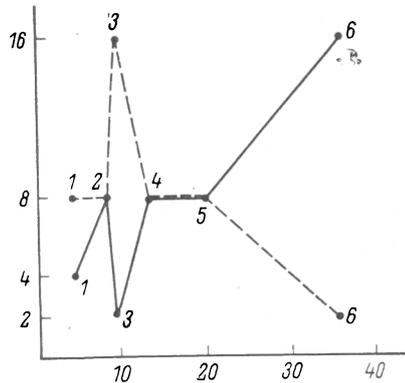


Рис. 3. Интенсивность инвазии и соотношение уровней паразитарного антигена в желчи и соответствующих антител в сыворотке крови кроликов при экспериментальном фасциолезе.

По оси абсцисс — число фасциол в желчных протоках, по оси ординат — титры антигена и антител, сплошная линия — антигенная активность желчи, пунктир — уровень антител в сыворотке крови, 1—6 — номера животных.

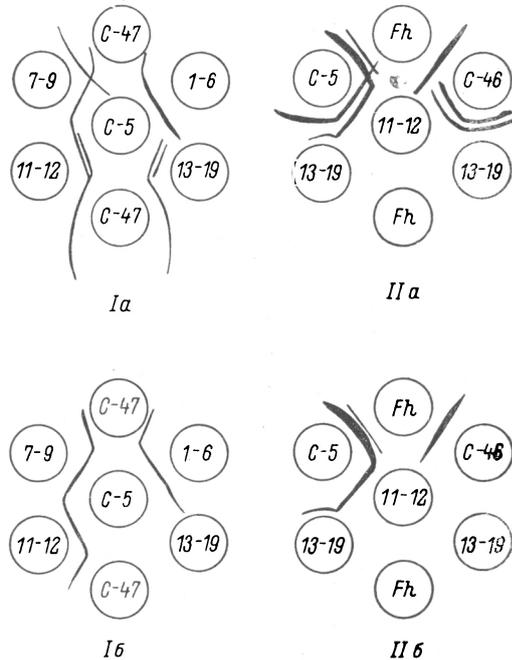


Рис. 4. Реакция желчи с образованием полос преципитации, неокрашиваемых амидошварцем.

Ia, IIa — результаты реакции до окрашивания гелей; Ib, IIb — то же после высущивания и окраски гелей; C-46, C-47 — соответственно крысиная и овечья сыворотки, полученные в период миграции *F. hepatica*; C-5 — сыворотка кролика № 5 с продолжительностью инвазии 6 мес.; Fh — белковый экстракт из взрослых фасциол. В остальных лунках — смесь желчи кроликов (1—6), овец (7—9) и крупного рогатого скота с интенсивной (11—12) и слабой (13—19) инвазией.

специфический паразитарный антиген не был обнаружен. Кроме того, фасциолез не был подтвержден ни овоскопически, ни исследованием сыворотки больных на наличие антител. Один из этих больных перенес фасциолез в прошлом.

Таким образом, реакция желчи с образованием неокрашиваемой полосы преципитации является результатом или хранения желчи, или патологии, не обязательно связанной с фасциолезом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие в желчи зараженных животных секретлируемого паразитами специфического антигена позволяет применить при фасциолезе новый диагностический подход, не зависящий от иммунного ответа хозяина. Известно, что недостатком иммунодиагностики, основанной на обнаружении антител, являются положительные реакции у переболевших индивидуумов. В частности, при фасциолезе обнаружение антител возможно спустя определенное время после дегельминтизации (Саргон е. а., 1964; Клименко, 1971а) и, очевидно, в равной степени после естественной элиминации паразитов. С другой стороны, при наличии инвазии антителообразование по разным причинам может быть подавлено. Так, например, как было показано ранее (Клименко, 1971, 1971а) и подтверждено в данной работе, наблюдается закономерный спад уровня антител при хроническом фасциолезе овец.

Наличие антигена в желчи связано с присутствием паразитов, причем его титры находятся в прямой зависимости от интенсивности инвазии. Конечно, эта зависимость неидеальна, так как на нее оказывают влияние

многие факторы: функциональная активность и размеры печени (желчного пузыря), метаболическая активность паразитов и их размеры и т. д. Возможно, на уровне антигена в желчи сказывается и уровень антител в сыворотке. При избытке антител, по-видимому, происходит связывание свободного антигена в желчи и его количество может не соответствовать интенсивности инвазии (рис. 3, кролик № 3). В таких случаях более эффективным окажется диагностический подход на обнаружение антител.

Одновременно с выявлением в желчи зараженных животных специфического антигена в ней найдены и яйца фасциол, поэтому для диагностики исследованной стадии инвазии проще использовать овоскопические методы. Однако известно, что эти методы даже в период половой зрелости паразитов недостаточно эффективны, что находило подтверждение и в нашей практике (Озерецковская и др., 1977), и совершенно неэффективны на ранних стадиях инвазии, когда паразиты еще не достигли половой зрелости.

Исследование желчи на присутствие антигена, секретлируемого паразитами в период миграции, мы не проводили, но наличие у зараженных животных антител, комплементарных специфическому антигену (Клименко, 1971а), является косвенным доказательством его секретирования в желчь на этой стадии. Однако здесь необходимо исследование степени возможной инактивации антигена в условиях более тесного контакта с иммунокомпетентной системой хозяина. Что касается периода, когда незрелые паразиты уже находятся в желчных протоках, то результаты не должны отличаться от тех, которые получены в нашей работе. Таким образом, рекомендуемый нами подход позволяет выявить фасциолез значительно ранее, чем при использовании овоскопических методов.

Применение данного подхода в ветеринарной практике, по-видимому, нереально, но в медицине, где широко применяется взятие проб желчи посредством дуоденального зондирования, он может быть успешно использован. В связи с тем что специфический антиген обнаружен в желчи всех исследованных видов животных как в эксперименте, так и при естественной инвазии имеются все основания предполагать его секрецию в желчь при паразитировании фасциол у человека. Во всяком случае, нам удавалось обнаруживать в сыворотке больных людей антитела, соответствующие этому антигену (Озерецковская и др., 1977).

Определенный интерес представляет реакция желчи с образованием полос преципитации, не связывающихся с красителем, специфически окрашивающим белки, в том числе и иммунные комплексы. Как вытекает из полученных данных, компонент желчи, обуславливающий такую реакцию, неспецифичен. Вряд ли он имеет паразитарное происхождение, так как неокрашиваемый преципитат образуется независимо от интенсивности инвазии и имеет место даже при очень слабом заражении. Можно предположить, что эта реакция связана с аутоиммунными процессами. Однако неокрашиваемость преципитата и тот факт, что нормальная желчь, не реагирующая с сыворотками, начинала с ними реагировать после хранения, вызывает сомнение в иммунологической природе наблюдаемой реакции.

В литературе описано образование неокрашиваемого преципитата в реакциях между желчью крупного рогатого скота, зараженного *F. hepatica*, и антигенами личинок фасциол, на основании чего автор связывает наблюдаемую реакцию с присутствием в желчи антител, а неокрашиваемость преципитата он объясняет комплексированием антител с желчными кислотами (Gajos, 1968). По нашим данным, желчь реагировала не с антигенами, а с сыворотками, следовательно, нет оснований связывать образование неокрашиваемого преципитата с наличием свободных антител в желчи.

В предварительной публикации (Клименко, 1977а) мы акцентировали внимание на обнаружении в желчи диагностически ценного антигена фасциол и не сообщали о реакции с образованием неокрашиваемого преципитата. Однако этот факт заслуживает внимания в связи с возможностью диагностических ошибок, обусловленных упомянутой реакцией. Так, в аналогичной работе по обнаружению антигена в желчи при описторхозе

(Ермолин и др., 1977) при отсутствии данных по идентификации и характеристике антигена нельзя полностью исключить реакцию с образованием неокрашиваемого преципитата, которая, как показано нами, не имеет диагностического значения.

ВЫВОДЫ

1. Методом иммунодиффузии исследовали желчь кроликов, овец и крупного рогатого скота, экспериментально и естественно зараженных *F. hepatica*. Для постановки реакции использовали сыворотки экспериментально зараженных *F. hepatica* белых крыс, кроликов и овец, полученные как в период миграции, так и на стадии половой зрелости паразитов. В качестве контроля использовали различные соматические антигены *F. hepatica*, желчь и сыворотки незараженных животных и сыворотки животных с другими гельминтами.

2. При интенсивной инвазии в желчи всех животных обнаружен антиген, иммунологически идентичный с соматическим белковым антигеном *F. hepatica* с молекулярным весом 27 500. Титры этого антигена в желчи каждого животного в целом находились в прямой зависимости от числа фасциол в желчных протоках и, как правило, были значительно выше (особенно у сельскохозяйственных животных), чем титры соответствующих антител в сыворотке крови. В желчи слабо инвазированных и незараженных животных антигены фасциол не обнаружены.

3. В желчи наиболее интенсивно зараженных животных выявлено дополнительно по 1—2 слабореагирующих антигенных компонента. Один из них идентичен с соматическим высокомолекулярным белковым антигеном фасциол, другие не идентифицированы.

4. При исследовании антигенной активности сыворотки крови и мочи наиболее интенсивно зараженных животных получены отрицательные результаты.

5. При постановке реакции желчи зараженных овец и крупного рогатого скота с сыворотками животных, зараженных *F. hepatica*, образуется независимо от интенсивности инвазии полоса преципитации, неокрашиваемая амидошварцем. Желчь незараженных сельскохозяйственных животных и желчь зараженных кроликов подобной полосы не образуют. Реакция с образованием неокрашиваемой полосы преципитации может быть также результатом или длительного хранения нормальной желчи, или патологии, не обязательно связанной с фасциолезом.

Литература

- Гусев А. И. 1968. Микрометод преципитации в агаре. — Иммунохимический анализ. М.: 99—119.
- Ермолин Г. А., Пономарева А. Н., Забозлаев А. Г., Козлов А. И., Скарედнов Н. И. 1977. Иммунохимическая диагностика описторхоза. 1. Выявление иммунологически активного компонента в желчи больных. — В кн.: Проблема описторхоза в Западной Сибири. Л.: 49—52.
- Клименко В. В. 1971. Разделение и характеристика функциональных антигенов *Fasciola hepatica* и *F. gigantica*. — Тр. Всес. ин-та гельминтол., 18: 131—145.
- Клименко В. В. 1971а. Исследование динамики антител при экспериментальном фасциолезе овец. — Тр. Всес. ин-та гельминтол., 18, 145—152.
- Клименко В. В. 1977. Сравнительное исследование антигенной активности белковых экстрактов фасциол и продуктов их метаболизма. — Тр. Всес. ин-та гельминтол., 23: 75—81.
- Клименко В. В. 1977а. Исследование возможности иммунодиагностики фасциолеза. — Методы профилактики и борьбы с фасциолезом и другими трематодозами жвачных в обводняемых и осушаемых зонах СССР. Тез. докл. Всес. конф. (Великие Луки, 21—23 июня 1977 г.). М.: 47—49.
- Озерецковская Н. Н., Клименко В. В., Бронштейн А. М., Фирсова Р. А., Пантелеева Е. Я. 1977. Диагностика фасциолеза у людей и его терапия. — Методы профилактики и борьбы с фасциолезом и другими трематодозами жвачных в обводняемых и осушаемых зонах СССР. Тез. докл. Всес. конф. (Великие Луки, 21—23 июня 1977 г.). М.: 70—71.
- Walden M. P., Weller T. H. 1974. *Schistosoma mansoni* circulating antigen: detection by complement fixation in sera from infected hamsters and mice. — Amer. J. Trop. Med. and Hyg., 23 (6): 1077—1084.

- Berggren W. L., Weller T. H. 1967. Immunoelectrophoretic demonstration of specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. — Amer. J. Trop. Med. and Hyg., 16 (5) : 606—612.
- Capron A., Biguet J., Tran van Ky Ph., Rosé G. 1964. Possibilités nouvelles dans le diagnostic immunologique de la distomatose humaine a «*Fasciola hepatica*». Mice en évidence d'anticorps sériques par immunoelectrophorese. — Presse medicale, 72 (52) : 3103—3107.
- Garlier Y., Bout D., Bina J. C., Camus D., Figueiredo J. F. M., Capron A. 1975. Immunological studies in human schistosomiasis. I. Parasitic antigen in urine. — Amer. J. Trop. Med. and Hyg., 24 (6) : 949—954.
- Gajos E. 1968. L'étude des anticorps précipitants dans la bile de bovins infectés par *Fasciola hepatica*. — Wiadom. Parazytol., 14 (5—6) : 721—722.
- Gold R., Rosen R. S., Weller T. H. 1969. A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*. Detection of antigen in serum and urine and correlation between antigenic concentration and worm burden. — Amer. J. Trop. Med. and Hyg., 18 (4) : 545—552.
- Movsesijan M., Borojevic D. 1973. Antigenic analysis of *Fasciola hepatica*: Extraction and fractionation. — Proceedings of a research co-ordination meetings Kabete, 22—26 november 1971 organized by the Joint FAO/IAEA. Division of Atomic Energy in Food and Agriculture International Atomic Energy Agency, Vienna : 11—22.
- Nash T. E., Prescott B., Neva F. A. 1974. The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. — J. Immunol., 112 (4) : 1500—1507.
- Tailliez R., Korach S. 1970. Les antigènes de *Fasciola hepatica*. II. Étude immunologique et localisation in situ d'un antigène spécifique du genre. — Ann. Inst. Pasteur, 118 (3) : 330—339.

THE FINDING OF THE SPECIFIC ANTIGEN
OF *FASCIOLA HEPATICA* IN BILE,
A DIAGNOSTIC CRITERION OF FASCIOLOSIS

V. V. Klimenko

S U M M A R Y

The antigen activity of bile of rabbits, sheep and cattle infected with *F. hepatica* was investigated by the immunodiffusion method. The sera obtained from animals with experimental fasciolosis and other infections were used. At the experimental fasciolosis and intensive natural infection antigens were found in bile, one of which was present in all the animals and turned to be identical immunologically to the specific protein antigene (molecular weight is 27500) isolated from the extract of *F. hepatica*. Titres of this antigene in bile depended usually on the infection intensity and were, as a rule, higher than titres of corresponding antibodies in the blood serum. The presence of this antigen in bile can serve as a diagnostic indication of fasciolosis especially when oviscope or immunological methods based on the finding of antibodies are inefficient.