МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ПО ДИАГНОСТИКЕ ТЕНУИКОЛЬНОГО ЦИСТИЦЕРКОЗА КЛЕТОЧНЫМ АНТИГЕНОМ

В.К. БЕРЕЖКО
доктор биологических наук
О.В. РУДНЕВА
кандидат биологических наук
А.А. ХАЙДАРОВА
аспирант
Л.А. НАПИСАНОВА
кандидат биологических наук
Е.И. МАЛАХОВА
доктор ветеринарных наук
Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина,
117218, г. Москва, ул. Б.Черемушкинская, 28, e-mail: vigis@ncport.ru

(Одобрены секцией «Инвазионные болезни животных» Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 27 сентября 2012 г., протокол № 3)

Введение

Необходимость разработки иммуноферментной диагностической тест-системы при тенуикольном цистицеркозе вызвана тем, что близкое антигенное родство возбудителя этой инвазии – *Cysticercus tenuicollis* с возбудителем ларвального эхинококкоза – *Echinococcus granulosus* – в большинстве случаев не позволяет дифференцировать эти инвазии. Имея же на вооружении иммунодиагностические тесты при обоих гельминтозах можно по степени проявления реакции более объективно оценить зараженность животных и соответственно эпизоотическую ситуацию.

Близкое антигенное родство между *C. tenuicollis* и *E. granulosus* доказано многочисленными иммунохимическими исследованиями (Н.А. Мунтян, 1971; W. Yong, D.D. Heath, 1984; T.K. Varma et al., 1986; M.D. Rickard, D.J. Jenkins, 1986; В.К. Бережко, 1994). Тем не менее, в антигенном спектре каждого паразита имеются видоспецифические комплексы, на которые на определенном этапе инвазионного процесса вырабатываются антитела, выявление которых иммунологическими реакциями дает возможность проводить дифференциальную диагностику.

Исходя из этих соображений и учитывая широкое распространение тенуикольного цистицеркоза, была проведена работа по получению диагностического антигена из протосколексов *C. tenuicollis* клеточной технологией и разработке на его основе иммуноферментной диагностической тест-системы.

Диагностический антиген представляет собой комплекс иммунологически активных клеточных метаболитов (клеточный антиген), полученных путем культивирования клеток протосколексов *C. tenuicollis*, выделенных из тенуикольных пузырей зараженных овец.

Иммуноферментная диагностическая тест-система предназначена для проведения сероэпизоотологических исследований при тенуикольном цистицеркозе и дифференциальной иммунодиагностике ларвального эхинококкоза.

Оборудование

Гомогенизатор стеклянный ручной; CO_2-инкубатор; центрифуга лабораторная для осаждения клеток; спекторофотометр СФ-26 (ЛОМО); планшеты для культивирования клеток; центрифужные пробирки; пипетки автоматиче-

ские переменного объема на 20, 200, 500 мл; полистироловые планшеты для иммуноферментного анализа; термостат; анализатор колориметрический иммуноферментный (длина волны 492 нм).

Реактивы, оборудование

Искусственные питательные среды RPMI-1640; DMEM; Игла-МЕМ; эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота; бычий сывороточный альбумин; ортофенилендиамин; твин 20, 40; перекись водорода (50%-ный раствор стабилизированный); серная кислота (водный раствор 1 : 1); 0,9%-ный раствор хлористого натрия; 0,01М карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 9,6; 0,01 М фосфатно-солевой буфер, pH 7,2–7,4 (ФСБ); 0,5 М цитратный буфер, pH 4,7–5,0.

1. Описание процесса работы

Разработка иммуноферментной диагностической тест-системы включает следующие этапы:

1.1. Получение протосколексов *C. tenuicollis* и приготовление клеточной культуры.

1.2. Культивирование клеток протосколексов *C. tenuicollis* в искусственной питательной среде.

1.3. Получение клеточных метаболитов – клеточных антигенов.

1.4. Получение положительной контрольной сыворотки.

1.5. Получение нормальной сыворотки (отрицательный контроль).

1.6. Приготовление буферных растворов, конъюгата, субстрата.

1.7. Контроль диагностической активности «клеточного» антигена протосколексов *C. tenuicollis*.

1.8. Разработка твердофазной иммуноферментной реакции (ИФР «ELISA») при тенуикольном цистицеркозе с «клеточным» антигеном протосколексов *C. tenuicollis*.

1.8.1. Определение оптимальной концентрации «клеточного» антигена для иммобилизации на полистироловые планшеты.

1.8.2. Определение диагностического титра сывороток.

1.8.3. Инкубирование с образцами исследуемых сывороток.

1.8.4. Инкубирование с антивидовыми антителами, меченными пероксидазой (конъюгат).

1.8.5. Проявление и оценка результатов реакции.

1.8.6. Оценка диагностической эффективности иммуноферментной тест-системы при тенуикольном цистицеркозе.

1.9. Санитарные правила работы с исходным материалом, производственные отходы, методы их уничтожения и обеззараживания.

1.1. Получение протосколексов C. tenuicollis и приготовление клеточной культуры

Для приготовления диагностического клеточного антигена используют протосколексы *C. tenuicollis*, выделенные из тенуикольных пузырей.

Тенуикольные пузыри получают от убойных естественно инвазированных тенуикольными цистицерками животных. Накопленный биоматериал из протосколексов *C. tenuicollis* промывают не менее 3–5 раз стерильным физиологическим раствором с антибиотиками из расчета 2000 ЕД/мл пенициллина и 1 мг/мл стрептомицина. Отмытый материал подвергают измельчению в ручном стеклянном гомогенизаторе с добавлением 0,5–1,0 мл стерильного раствора Хэнкса до получения однородной массы или 0,25%-ного раствора трипсина. По окончании процедуры гомогенизации полученную массу пропускают через мельничный газ с диаметром ячеек до 1 мм для освобождения от крупных кусочков. В полученную массу добавляют 1–2 мл стерильного физраствора, клетки осаждают центрифугированием при 1000–1200 об/мин в течение 7–10 мин. Осадок ресуспендируют и промывают 3–5 раз, определяют

жизнеспособность клеток в камере Горяева после окрашивания 0,4%-ным раствором трипанового синего при увеличении микроскопа 20 х 10 общепринятым методом.

1.2. Культивирование клеток протосколексов C. tenuicollis в искусственной питательной среде

Полученную суспензию клеток протосколексов *C. tenuicollis* перед культивированием промывают не менее 5–7 раз стерильным физиологическим раствором посредством центрифугирования при 1000–1200 об/мин в течение 10 мин, доводят концентрацию клеток в суспензии до 600–800 тыс./мл и вносят в ростовые среды, основу которых составляют синтетические питательные среды такие, как RPMI-1640; DMEM или Игла-МЕМ. Ростовые среды представляют собой смесь синтетической питательной среды, 5–7 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 2 мл/100 мл среды альфа-глутамина и 8 г/100 мл гентамицина. Клеточную культуру помещают в CO_2-инкубатор для культвирования при температуре 37 °С, влажности 70 % и содержания CO_2 – 5 %. На 7–10-е сутки культивирования при оптимально подобранных условиях, как правило, регистрируют получение монослоя клеток в культуре.

1.3. Получение клеточных метаболитов – «клеточных» антигенов

В процессе культивирования клеток протосколексов *C. tenuicollis* с периодичностью 7–10 сут проводят отбор клеточных метаболитов и их проверку ИФР с использованием положительных и отрицательных контрольных сывороток для определения наличия в них антигеноактивных компонентов *C. tenuicollis*.

Серии клеточных метаболитов, содержащих антигеноактивные диагностически эффективные белковые компоненты, разливают по флаконам и хранят при - 20 °С и используют для разработки на их основе иммуноферментной диагностической тест-системы при тенуикольном цистицеркозе.

1.4. Получение положительной контрольной сыворотки

Положительную контрольную сыворотку, представляющую собой сыворотку естественно инвазированных *C. tenuicollis* овец, получают при убое.

Кровь собирают в стерильную стеклянную посуду в процессе полного обескровливания туш, оставляют на 1 ч при 37 °С, затем переносят в холодильник (4–6 °С) на 16–18 ч, стерильно отсасывают образовавшуюся сыворотку и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 15–20 мин, осадок эритроцитов удаляют.

Сыворотку проверяют на наличие антител к антигенам *C. tenuicollis* иммунопреципитационным тестом и на активность в ИФР.

Для определения активности положительной контрольной сыворотки ее разводят в соотношении 1 : 20 до 1 : 1600 и исследуют ИФР с антигеном *C. tenuicollis*. Сыворотку считают активной, если она дает положительный ответ в минимальном диагностическом титре 1 : 100 и выше.

Положительно реагирующие с антигеном *C. tenuicollis* сыворотки, удовлетворяющие требованиям контроля, в стерильных условиях разливают по ампулам в объеме 1 мл, замораживают и хранят при – 20 °С. Сыворотку этикетируют.

1.5. Получение нормальной сыворотки (отрицательный контроль)

В качестве нормальной сыворотки используют сыворотки крови, полученные от убойных овец, при вскрытии которых не обнаружены тенуикольные и эхинококковые пузыри, и после проверки в ИФР антитела к антигенам *C. tenuicollis* и *E. granulosus* не регистрировали.

Сыворотку считают нормальной и используют в дальнейшем как отрицательный контроль, если с антигеном *C. tenuicollis* она дает положительную реакцию не выше титра 1 : 40.

Такие сыворотки расфасовывают по флаконам, этикетируют и хранят при – 20 °С.

1.6. Приготовление буферных растворов, конъюгата и субстрата

Карбонатно-бикарбонатный буфер (0,01 М; pH 9,6) – в 1 л дистиллированной воды растворяют 1,06 г углекислого натрия (Na_2CO_3) и 1,95 г натрия двууглекислого ($NaHCO_3$).

Фосфатно-солевой буфер (0,01 М; pH 7,2) – 8,5 г хлористого натрия (NaCl); 1,42 г двузамещенного фосфорнокислого натрия (Na_2HPO_4); 0,2 г хлористого калия (KCl) и 0,2 г однозамещенного фосфорнокислого натрия (NaH_2PO_4) растворяют в 1 л дистиллированной воды, добавляют 0,5 мл твина-20 или твина-40.

Цитратный буфер (0,05 М; pH 4,7–5,0) – готовят растворы А и Б.

Раствор А. При молекулярной массе цитрата натрия, равной 294,1, необходимо 14,7 г растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Раствор Б. 7,2 г лимонной кислоты растворяют в 0,5 л дистиллированной воды.

Рабочий буферный раствор готовят смешиванием 500 мл раствора А и 180 мл раствора Б (pH 4,7–5,0)

Конъюгат представляет собой глобулиновую фракцию, выделенную из антисыворотки, полученной иммунизацией животных-продуцентов глобулинами сыворотки соответствующего вида животного, меченную пероксидазой. Каждую партию конъюгата перед употреблением необходимо титровать для подбора оптимального разведения.

Приготовление субстратной смеси: 10 мг ортофенилендиамина растворяют в 20 мл цитратного буфера. Перед внесением субстрата в лунки полистиролового планшета к нему добавляют 10 мл стабилизированной перекиси водорода.

1.7. Контроль диагностической активности «клеточного» антигена протосколексов C. tenuicollis

Активность «клеточного» антигена определяют в ИФР с использованием 2–3 положительных сывороток (животных, зараженных *C. tenuicollis*), 2–3 нормальных и 2–3 сывороток животных с гетерологичной инвазией. Сыворотки доводят титрованием фосфатно-солевым буфером с твином-20 с добавлением 0,05%-ного бычьего сывороточного альбумина до диагностического титра 1 : 100. Разведенные в диагностическом титре сыворотки вносят по 0,1 мл в каждую лунку, предварительно сенсибилизированную антигеном и инкубируют 60 мин при температуре 37 °С. По окончании инкубации не прореагировавшие компоненты удаляют из лунок путем 3-кратного промывания дистиллированной водой с 0,05%-ным твином-20. Оставшуюся часть воды в лунках удаляют встряхиванием планшетов. В каждую лунку вносят по 0,1 мл конъюгата, доведенного фосфатно-солевым буфером с 0,5%-ным альбумином до нужного титра. Планшеты с конъюгатом инкубируют 60 мин при 37 °С, после инкубации планшеты промывают как указано выше и вносят в лунки по 0,1 мл субстратной смеси.

Оценку реакции проводят спектрофотометрически. По результатам реакции определяют наличие в испытуемом антигене диагностически активных компонентов, способных выявлять антипаразитарные антитела в сыворотке зараженных животных. Антиген считают диагностически активным, если с положительными контрольными сыворотками в разведении 1 : 100 и выше получен положительный результат, а с нормальными и гетерологичными в этом же разведении – отрицательный.

1.8. Разрабока твердофазной иммуноферментной реакции (ИФР – «ELISA») при тенуикольном цистицеркозе с «клеточным» антигеном протосколексов C. tenuicollis

1.8.1. Определение оптимальной концентрации «клеточного» антигена для иммобилизации на полистироловые планшеты

Оптимальную концентрацию антигена определяют путем внесения в лунки планшета «клеточного» антигена протосколексов *C. tenuicollis* от неразведенного до разведения 1 : 64 при кратности разведения равной двум. Для разведения используют комплексирующий буфер (карбонатно-бикарбонатный, pH 9,6; 0,01 М). Каждое разведение антигена проверяют с положительной сывороткой от естественно инвазированного *C. tenuicollis* животного и нормальной сывороткой (отрицательный контроль) и напрямую с конъюгатом без сыворотки.

Оптимальным считают такое разведение антигена, при котором регистрируют максимальную разницу в оптической плотности между положительным и отрицательным контрольными сыворотками и минимальную фоновую реакцию с конъюгатом (антивидовые антитела, меченные пероксидазой) без сыворотки.

В подобранном оптимальном разведении антигена определяют содержание белка. Используемый нами «клеточный» антиген протосколексов *C. tenuicollis* показал наилучшие диагностические качества в разведении 1 : 4 (концентрация белка 40 мкг). Планшеты с иммобилизованным на их поверхности антигеном в оптимальной концентрации инкубируют в течение 30 мин при температуре 37 °С, а затем 18–20 ч при 4 °С.

По истечении этого времени планшеты отмывают трехкратно с интервалом 5 мин дистиллированной водой, содержащей 0,05% твина-20 (отмывочный раствор). Оставшуюся в лунках часть воды удаляют встряхиванием планшетов.

1.8.2. Определение диагностического титра сывороток

Для определения диагностического титра сывороток проводят сенсибилизацию полистироловых планшетов «клеточным» антигеном протосколексов *C. tenuicollis* в оптимально подобранном разведении и исследуют в ИФР не менее 15–20 сывороток от зараженных тенуикольными цистицерками животных с разным уровнем антител, а также нормальные сыворотки от незараженных животных.

Сыворотки титруют кратно двум от 1 : 20 до 1 : 800 фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,2–7,4 с 0,05 % бычьего сывороточного альбумина и 0,05 % твина-20. По результатам реакции (показатели оптической плотности) определяют диагностический титр, который в нашем случае составил 1 : 100.

1.8.3. Инкубирование с образцами исследуемых сывороток

Исследуемые образцы сывороток разводят ФСБ pH 7,2–7,4 с 0,05% твина-20 и 0,05 % бычьего сывороточного альбумина в соотношении 1 : 100 и вносят в лунки планшета, сенсибилизированного «клеточным» антигеном протосколексов *C. tenuicollis* в оптимальной концентрации в количестве 100 мкл.

Инкубирование сывороток проводят в термостате при 37°С в течение 60 минут. После инкубации содержимое лунок удаляют и промывают планшеты отмывочным раствором 3 раза по 5 минут (см. пункт 1.8.1.).

1.8.4. Инкубирование с антивидовыми антителами, меченными пероксидазой (конъюгат)

Конъюгат используют в рабочем разведении, который определяют в предварительных испытаниях, используя положительную и отрицательную

контрольные сыворотки и оптимальное разведение антигена. Конъюгат разбавляют ФСБ pH 7,2–7,4, содержащим 0,5 % бычьего сывороточного альбумина и 0,05 % твина-20 до разведения 1 : 6000 и вносят в каждую лунку планшета по 100 мкл.

Инкубирование с конъюгатом проводят в термостате при температуре 37 °С в течение 45 мин. По окончании инкубирования с конъюгатом содержимое лунок удаляют и промывают планшет 3 раза по 5 мин (см. пункт 1.8.1.).

1.8.5. Проявление и оценка результатов реакции

Для проявления реакции готовят хромогенный субстрат, включающий 20 мл цитратного буфера, 10 мг ортофенилендиамина и 3,5 мкл 50%-ного водного раствора перекиси водорода. Перекись водорода добавляют в раствор непосредственно перед нанесением в лунки планшета.

Раствор субстратной смеси вносят в лунки планшета в количестве 100 мкл, планшет помещают в темное место на 10–15 мин при комнатной температуре до проявления реакции, о которой судят по изменению цвета раствора в лунках, ориентируясь на положительный контроль.

После проявления реакцию останавливают добавлением в каждую лунку по 30 мкл стоп-реагента, в качестве которого используют концентрированную серную кислоту (H_2SO_4), разбавленную дистиллированной водой в соотношении 1 : 1.

Результаты реакции оценивают визуально по интенсивности окрашивания раствора в лунках в сравнении с контрольными сыворотками. Результат считают отрицательным, если окрашивание раствора отсутствует или наблюдается слабый фон, по интенсивности не превышающий фон с отрицательной контрольной сывороткой. Реакцию считают положительной, если раствор в лунках окрашен от светло-желтого до темно-желтого цвета.

<u>Шкала визуальной оценки реакции</u>

«+++»	Цвет темно-желтый – сильноположительная
«++»	Цвет желтый – положительная
«+»	Цвет светло-желтый – слабоположительная
«–»	Слабый фон или его отсутствие – отрицательная

При инструментальной оценке при длине волны 492 нм по разнице оптической плотности в сравнении с отрицательной контрольной сывороткой определяют положительно реагирующие сыворотки.

Положительными считают сыворотки, превосходящие по оптической плотности отрицательный контроль на 0,1.

1.8.6. Оценка диагностической эффективности иммуноферментной тест-системы при тенуикольном цистицеркозе

Для проверки диагностической эффективности иммуноферментной тест-системы при тенуикольном цистицеркозе проводят сенсибилизацию планшета «клеточным» антигеном протосколексов *C. tenuicollis* в оптимальной концентрации (40 мкг белка) и вносят в 4 лунки по 0,1 мл положительной сыворотки в диагностическом титре 1 : 100, в 4 лунки по 0,1 мл нормальной сыворотки (отрицательный контроль) и в 4 лунки – сыворотки с гетерологичной инвазией по 0,1 мл в том же титре. Остальные лунки планшета заполняют сыворотками убойных животных с подтвержденным диагнозом тенуикольного цистицеркоза и других гельминтозов, а также клинически здоровых. Постановку и учет результатов реакции проводят, как указано в пункте 1.8. Иммуноферментный тест считают диагностически эффективным, если с сыворотками животных, инвазированных тенуикольными цистицерками, реакция

положительная, а с гетерологичными и нормальными сыворотками в большинстве случаев – отрицательная. Возможен слабоположительный результат (ложноположительная реакция) с сыворотками животных, больных эхинококкозом и другими ларвальными цестодозами, что влияет на чувствительность и специфичность реакции. Чувствительность теста была в пределах 79,3–81,7 %, специфичность 73,5–77,6 %.

1.9. Санитарные правила работы с исходным материалом, производственные отходы, методы их уничтожения и обеззараживания

Работу по получению «клеточного» антигена из протосколексов *C. tenuicollis* необходимо проводить в оборудованном боксовом помещении. С паразитарным материалом должны работать лица, хорошо владеющие техникой работы, предварительно получившие специальный инструктаж по методам обработки гельминтозного материала.

Работа в условиях повышенной влажности в резиновых перчатках. При работе с центрифугами необходимо тщательно уравновесить содержимое центрифужных стаканов, соблюдать осторожность при разгоне и торможении ротора.

Производственные безвредные отходы технологического порядка, не являющиеся источником патогенной для людей инвазии, не токсичные, не выделяющие ядовитых газов и паров, к которым относятся все виды выбракованных при контроле препаратов, дистиллированная и водопроводная вода, используемая для отмывания планшетов, удаляются через канализационную систему.