

ВЫЯВЛЕНИЕ КОПРОАНТИГЕНОВ ПРИ ТРИХИНЕЛЛЕЗЕ РЕАКЦИЕЙ СЭНДВИЧ-ИФА

Написанова Л.А.

ФГБНУ «Всероссийский НИИ фундаментальной и прикладной
паразитологии животных и растений им. К.И.Скрябина»

Введение. Трихинеллез, один из наиболее опасных гельминтозоонозов, имеет широкое распространение в различных природных зонах. Это инвазионное заболевание представляет собой серьезную медицинскую, ветеринарную и социально-экономическую проблему, поэтому во многих странах с неизменным постоянством проводятся комплексные ветеринарно-медико-биологические исследования по данной проблеме.

Прижизненная диагностика трихинеллеза с помощью иммунологической реакции имеет большое значение при разработке мероприятий по борьбе с этим социально опасным заболеванием. Совершенствование методов очистки антигенов, методик постановки реакций, приготовления реагентов способствует развитию иммунодиагностики, повышению эффективности реакций.

Среди множества тест-систем на основе иммуноферментного анализа (ИФА), которые достаточно часто используются в медицинской, а также и в ветеринарной практике, сэндвич-ИФА позволяет обнаруживать антигены паразита в различных биологических жидкостях зараженных животных и выявлять инвазию на самых ранних стадиях [2, 5, 3].

В связи с вышеизложенным, целью наших исследований была разработка тест-системы сэндвич-ИФА для выявления антигенов в экстракте фекалий (копроантигенов) при трихинеллезе. Это позволит обнаруживать антигены на кишечной стадии развития паразита, а также упростить и сделать более безопасным отбор проб для исследования у животных.

Материалы и методы. Для проведения работы белых беспородных крыс заражали личинками лабораторного штамма *Trichinella spiralis* разными дозами. Через 45-60 дней методом переваривания в искусственном желудочном соке (ИЖС) получали инвазионных личинок трихинелл. Жизнеспособность проверяли под микроскопом. Часть выделенных личинок использовали для заражения животных. Другую часть выделенных личинок накапливали до необходимого объема, замораживая и сохраняя при температуре минус 20°C до использования. Личинок трихинелл измельчали вручную на холоде до получения гомогенной массы, применяя прием поочередного замораживания-оттаивания. Процесс измельчения контролировали с помощью бинокля при увеличении $\times 32$. Экстрагирование проводили в течение 20 часов в физиологическом растворе в соотношении 1:4 на магнитной мешалке при 4°C. По окончании экстрагирования суспензию центрифугировали при 20000 об./мин в течение 30 минут при 4°C, осадок удаляли, а супернатант использовали в качестве экстракта. Концентрацию белка здесь и в последующем определяли по

калибровочной кривой (предварительно построенной) на спектрофотометре Ломо-26 при длине волны 280 нм [1].

Очищенный антиген трихинелл готовили из экстракта методом гель-хроматографии. Разделение на фракции проводили на колонке, заполненной сорбентом Superose 12 Prep Grade с учетом замечаний Mayer, 1987. У полученных в процессе разделения фракций измеряли содержание белка и проверяли на активность и специфичность в иммуноферментной реакции. Отобранные фракции сливали вместе, измеряли содержание белка и использовали в дальнейшем для получения антител к антигенам *T. spiralis*.

Антитела (IgG) к *T. spiralis* получали из гипериммунной кроличьей сыворотки, используя методы осаждения и аффинной хроматографии.

Конъюгат готовили из очищенных аффинной хроматографией кроличьих IgG к *T. spiralis*, применяя периодатный метод, в качестве ферментной метки использовали пероксидазу хрена.

Экстракты фекалий получали следующим образом: свежесобранные фекалии тщательно смешивали с физиологическим раствором в соотношении 1 грамм фекалий и 2 мл физ. раствора, затем центрифугировали при 8 тыс. об./мин в течение 5-10 мин на холоде. Надосадочную жидкость использовали в качестве испытуемого образца. Образец сохраняли до использования при минус 20 °С.

С целью постановки сэндвич-ИФА провели отработку параметров и режимов постановки реакции – определили оптимальную концентрацию антител, режим их фиксации на полистироловых планшетах, буфер для разведения; определили минимальный диагностический титр сывороток, рабочее разведение конъюгата и режимы инкубации сывороток и конъюгата.

Результаты. Для выполнения работы заразили личинками лабораторного штамма *T. spiralis* 31 беспородную крысу массой 120 г разными дозами. Четырнадцать крыс с дозой заражения по 2,5 тыс. личинок использовали для получения гельминтного материала. Остальные, получившие дозу по 4 личинки/г массы, использовали для сбора фекалий в разные сроки (4,12,20 день п/з) и приготовления из них экстрактов (17 проб). Из выделенных инвазионных личинок трихинелл, приготовили экстракт в количестве 12 мл с содержанием белка 16 мг/мл. В процессе гель-хроматографии экстракта на суперозе 12 Prep Grade получили 71 фракцию. Содержание белка во фракциях колебалось в пределах от 32 до 9000 мкг/мл. Проверили антигенную активность и специфичность фракций в ИФА. Наиболее диагностически эффективные фракции (5 образцов) объединили в пул, объем которого составил 15 мл, а содержание белка 1,8 мг/мл. Этот препарат использовали в качестве соматического очищенного антигена.

Антитела (IgG) к *T. spiralis* получали из гипериммунной кроличьей сыворотки выделением гамма-глобулиновой фракции с помощью метода осаждения. Затем из гамма-глобулиновой фракции методом аффинной хроматографии на сорбенте с белком А из *S. aureus* выделили IgG по методике производителя сорбента. Объем препарата антител составил 8 мл, содержание белка 0,5 мг/мл.

Постановку сэндвич-ИФА для выявления копроантигенов осуществляли на полистироловых планшетах отечественного производства.

Определение чувствительности тест-системы сэндвич-ИФА. При определении чувствительности использовали пул (смесь) экстрактов фекалий от незараженных трихинеллами лабораторных крыс. Пул разводили раствором для разведения образцов в диагностическом титре 1:2. В качестве положительного контроля использовали этот же пул, добавляя в него известную концентрацию – 800 нг/мл экскреторно-секреторного антигена трихинелл (ЭСАГ1) с последующим титрованием кратно 2 до концентрации 6.25 нг/мл. При автоматическом учете тест-система показала чувствительность 100 нг/мл (рис. 1). При визуальном учете различия между отрицательным и положительным образцом определялись только при концентрации антигенов 150-170 нг/мл. Фон присутствует, по-видимому, из-за использования конъюгата, приготовленного на основе менее очищенных антител к *T. spiralis*.

Далее провели предварительную проверку чувствительности на экстрактах фекалий от экспериментально зараженных *T. spiralis* крыс в дозе 4 лич/г массы животного и следующими сроками инвазии: 4, 12 и 20 дней (табл.).

Таблица

Выявление антигенов трихинелл в экстрактах фекалий экспериментально зараженных крыс при трихинеллезе

Экстракты фекалий (дни п/з <i>T. spiralis</i>)	Кол-во образцов	Результаты сэндвич-ИФА		
		положительный	сомнительный	отрицательный
4	6	3	2	1
12	6	5	1	0
20	5	1	2	2
Итого	17			

Как видно из таблицы, из 17 проб от инвазированных трихинеллами животных положительный результат дали 9 образцов, сомнительный – 5 и 3 – отрицательный результат. Отрицательные результаты регистрировали на сроках 4 и 20 дни после заражения. Причиной этого, на наш взгляд, является недостаточный уровень антигенов в образцах в данные сроки.

Таким образом, в опытах по постановке сэндвич-ИФА для выявления копроантигенов при трихинеллезе установили следующие оптимальные параметры и режимы реакции: концентрация очищенных антител для сенсibilизации полистиролового планшета 10 мкг/мл; титр испытуемых образцов (экстракт фекалий) – 1:2; режим сенсibilизации антител на полистироле – 18-20 часов при 4°C в 0.01М БКБ, рН 9.6; инкубация с

образцами 40 минут и с конъюгатом 30 минут в термостате при 37°C. Раствор для разведения образцов состоит из 0.01М ФСБ, рН 7.2 с 0.9М NaCl, 0.05% БСА и 0.05% твина-20; конъюгат разводили 1:250 в таком же растворе с добавлением 0.5% БСА. Отмывку после каждого этапа реакции проводили 3 раза по 5 минут 0.01М ФСБ рН,7.2 с 0.9М NaCl и 0.05% твином-20. Субстратную смесь с ортофенилендиамином готовили на цитратном буфере стандартно. Реакцию останавливали стоп-реагентом, который состоял из дистиллированной воды и концентрированной серной кислоты в соотношении 1:1. Учет реакции проводили визуально и на автоматическом ридере при длине волны 492 нм. Чувствительность тест-системы сэндвич-ИФА в данном опыте при автоматическом учете составила 100 нг/мл антигенов по белку.

Заключение. Использование более очищенных антител для сенсibilизации полистироловых планшетов позволило несколько повысить чувствительность сэндвич-ИФА при выявлении копроантигенов трихинелл, однако, для дальнейшего увеличения чувствительности реакции необходимо использовать конъюгат, также приготовленный с использованием более очищенных специфических антител к *T.spiralis*.

Литература: 1.Layne E.//Methods Enzymol.-1957.V.3.-P.447-454. 2.Ефремов Е.Е. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М. – 1982. – 217с. 3.Arriaga C., Yepez-Mulia L., Morilla A., Ortega-Pierres G. //Vet. Parasitol.-1995.-V.58(4).–P.319-326. 4.Mayer R.J., Walker J.H.//Immunochemical Methods in Cell and Molekular Biology, 1987. 5.Wolters G., Kuikpers L., Kacaki J. and Shuurs A.H.W.M.//J.clin.Path.-1976.-29.-P. 873-879.

Recovery of coproantigens at Trichinella infection using sandwich-IFA.
Napisanova L.A. All-Russian K.I. Skryabin Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants.

Summary. One represent the results of development of regimes and parameters of sandwich-IFA for recovery of coproantigens at Trichinella infection. The sensitivity of this test-system appears to be 100 ng/ml of antigens (according to the protein level) using the automatic recording procedure.

