

УДК 595.132.6 : 576.809.7

© 1992

## РАСТВОРИМЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ АНТИГЕНЫ *TRICHINELLA SPIRALIS*: ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА

А. Ф. Костецкий, Ю. И. Васерин

Культивирование мышечных личинок трихинелл, очищенных центрифугированием в 20...50%-ном градиенте плотности сахарозы, в безбелковых питательных средах в дозе  $3.5-4.0 \cdot 10^3$  лич./мл в присутствии инсулина позволило получить растворимый антиген трихинелл. Электрофорезом в полиакриламидном геле показано, что растворимый (секреторно-эксcretорный) антиген имеет три белковые фракции, тогда как в соматическом трихинеллезном антигене выявлялось 18 фракций. Показано, что растворимый (секреторно-эксcretорный) антиген может быть использован для иммобилизации на поверхности эритроцитов, что открывает возможности повышения чувствительности и специфичности серологических методов диагностики трихинеллеза.

Для серологической специфической диагностики трихинеллеза могут быть использованы соматические и метаболические (эксcretорно-секреторные, ЕС-антигены), получаемые при культивировании трихинелл в искусственных питательных средах. Возможность длительного культивирования (поддержания) мышечных личинок трихинелл для получения ЕС-антигена была показана многими исследователями (Бессонов, 1975; Полетаева и др., 1986; Gamble, Graham, 1984).

Анализ опубликованных работ выявил целый ряд ограничений, возникающих при культивировании трихинелл и получении ЕС-антигена: высокая концентрация трихинелл в среде культивирования, быстро наступающий процесс их гибели и возможность загрязнения среды культивирования продуктами их распада, наличие балластных белков в средах, низкий выход ЕС-антигена, стандартизированного по количеству белка и необходимость его последующей концентрации.

В настоящем сообщении приводятся данные по выживаемости мышечных личинок трихинелл при культивировании в различных безбелковых питательных средах, динамике накопления ЕС-антигена трихинелл и возможности его использования для получения эритроцитарного иммуносorbента.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Штамм трихинелл. Во всех опытах использовали мышечных личинок штамма *Trichinella spiralis*, полученного из ВИГИС ВАСХНИЛ СССР, который поддерживался в лабораторных условиях пассированием на неимбредных белых крысах.

Очистка и концентрация мышечных личинок трихинелл. Мышечных личинок получали методом переваривания мышечной ткани белых крыс на 45—60-й дни инвазии. Очистку трихинелл от пептолизата проводили отмыванием 0.15 М раствором натрия хлорида до отрицательной реакции надосадочной жидкости с 10%-ной трихлоруксусной кислотой. Дальнейшую чистку, выделение жизне-

способной фракции и концентрацию мышечных личинок трихинелл проводили изопикническим центрифугированием в 20 ... 50%-ном градиенте плотности сахарозы, как описано ранее (Васерин, Костецкий, 1989а, 1989б). Отмытых после центрифугирования личинок помещали в 0.15 М раствор натрия хлорида в концентрации  $10^6$  лич./мл.

Культивирование мышечных личинок трихинелл. Культивирование трихинелл осуществляли в питательных средах в присутствии инсулина, как это описано нами ранее (Васерин, Костецкий, 1989а, 1989б). В качестве сред поддержания использовали растворы Хенкса и Эрла, среду 199, среду Игла, 0.5%-ный раствор гидролизата лактальбумина с антибиотиками (100 мкг/мл канамицина, 100 мкг/мл леворина). Выживаемость мышечных личинок трихинелл определяли микроскопированием осадка. Жизнеспособными считали спиралевидных и подвижных личинок, к нежизнеспособным относили серповидных и неподвижных. Концентрацию белка в культуральной жидкости, свободной от мышечных личинок трихинелл, определяли методом Лоури (Кэбот, Мейер, 1968), ошибка метода  $\pm 15$  мкг/мл.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофорез в ПААГ проводили в вертикальных пластинах 10%-ного геля. Окраску белков осуществляли раствором кумасси синего (Такач, 1981).

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). Сенсибилизацию формализированных и танизированных эритроцитов барана осуществляли по ранее описанной методике (Костецкий, Васерин, 1988). При постановке РНГА в качестве стабилизирующего раствора использовали 0.33%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (Белорусского НИИЭМ) на 0.15 М солевом фосфатном буфере pH 7.2—7.4.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что мышечные личинки трихинелл сохраняют высокую жизнеспособность в течение первых 48 ч культивирования во всех питательных средах в присутствии инсулина и при всех испытанных дозах культивирования (табл. 1).

Через 60 ч культивирования высокая жизнеспособность мышечных личинок трихинелл отмечалась только в растворах Хенкса и Эрла при внесении  $10^3$  и

Таблица 1

Длительность выживания мышечных личинок трихинелл в искусственных питательных средах  
Duration of survival of *Trichinella* muscular larvae in artificial nutrient media

Концентрация личинок (лич./мл)	Время культивирования (часы)	Процент нежизнеспособных особей в средах культивирования				
		Хенкса	Эрла	199	Игла	Гидролизат лактальбумина
$10^3$	24	0.9±0.5	0.9±0.5	0.6±0.4	0.6±0.4	0.6±0.4
	48	1±0.6	0.9±0.5	0.6±0.4	0.6±0.4	0.6±0.4
	60	1±0.7	1±0.7	1.6±0.7	2.4±0.9	2.9±0.5
	72	2.8±0.9	2.4±0.8	2.7±1.1	3.1±1	3±1
	96	4.1±1.1	5.2±1.2	5.3±1.2	4.3±1.1	4.8±1.2
$3.5-4 \times 10^3$	24	0.6±0.3	0.6±0.3	1±0.4	0.9±0.5	1.2±0.6
	48	0.7±0.3	0.7±0.3	1.1±0.4	0.9±0.5	1.5±0.7
	60	0.7±0.3	0.7±0.3	2.6±0.5	2±0.6	2.1±0.8
	72	2.8±0.6	2.4±0.6	2.8±0.6	3±0.7	3±1
	96	5.7±0.8	5±0.8	5.5±0.9	4.4±1.1	4.8±1.2
$5 \times 10^3$	24	1.5±0.7	1.2±0.6	1.2±0.6	1.2±0.5	0.9±0.5
	48	1.5±0.7	1.2±0.5	1.5±0.5	1.5±0.5	1.4±0.6
	60	1.8±0.7	1.5±0.7	1.6±0.6	1.6±0.6	1.5±0.6
	72	3.5±1	3.1±0.9	3.9±1	3.0±0.9	3.5±1
	96	5±1	5.1±1.2	5.4±1.2	4.3±1.1	5.2±1.2

3.5—4.0×10<sup>3</sup> лич./мл, процент гибели личинок составлял 0.7—1. В синтетических питательных средах (среда 199, среда Игла) и гидролизате лактальбумина в этот период отмечалась потеря жизнеспособности у 1.6—2.9 % личинок. При внесении в среды культивирования более высокой дозы трихинелл (5.0×10<sup>3</sup> лич./мл) была выявлена относительно высокая гибель мышечных личинок трихинелл во всех средах. Через 72—96 ч культивирования процент погибших личинок увеличивался до 3.0—5.4 во всех испытанных культуральных средах при внесении всех доз трихинелл.

Таким образом, оптимальные условия для сохранения жизнеспособных мышечных личинок трихинелл создаются в солевых растворах (растворы Хенкса и Эрла) при дозе до 4.0×10<sup>3</sup> лич./мл и 60-часовом периоде культивирования.

При изучении динамики накопления ЕС-антигена в процессе культивирования мышечных личинок трихинелл в искусственных питательных средах была отмечена тенденция к увеличению выхода белка при удлинении срока культивирования (табл. 2). Из результатов проведенных опытов следует, что оптимальное соотношение между числом жизнеспособных трихинелл и количеством белка в среде культивирования отмечается при культивировании в течение 48—60 ч. В этот период количество погибших личинок сравнительно низко и вероятность загрязнения среды культивирования белковыми продуктами их распада минимальна. Оптимальная продукция ЕС-антигена отмечается при культивировании мышечных личинок трихинелл в солевых растворах Хенкса и Эрла, которые по составу питательных веществ могут быть отнесены к «голодным» средам. Дальнейшее культивирование одновременно с нарастанием содержания ЕС-антигена в культуральной жидкости приводит и к увеличению мертвых личинок. Так, уже через 72 ч культивирования количество погибших личинок настолько велико (2.4—4.1 %), что нельзя исключить возможность загрязнения среды культивирования денатурированными белками распадающихся личинок трихинелл.

Культуральная жидкость, содержащая ЕС-антиген, полученная через 48—60 ч культивирования, использовалась для изучения электрофоретической подвижности белков и способности адсорбироваться на поверхности формализированных и танализованных эритроцитов барана.

Т а б л и ц а 2

Динамика накопления белка ЕС-антигена в искусственных питательных средах при культивировании мышечных личинок трихинелл  
Protein accumulation dynamics in artificial nutrient media during the cultivation of *Trichinella* muscular larvae

Концентрация личинок (лич./мл)	Время культивирования (часы)	Число наблюдений	Концентрация белка в средах культивирования				
			Хенкса	Эрла	199	Игла	Гидролизат лактальбумина
10 <sup>3</sup>	24	10	57±6	59±6	50±4	52±10	40±6
	48	14	105±3	105±3	87±5	65±6	83±6
	60	15	107±2	106±2	88±2	88±6	98±2
	72	15	105±1	109±1	97±8	87±6	95±6
	96	10	118±8	119±1	182±11	175±10	127±8
3.5—4×10 <sup>3</sup>	24	15	91±3	97±2	45±5	47±2	40±6
	48	12	157±8	152±8	80±6	90±7	82±6
	60	12	155±6	157±8	80±6	110±4	100±7
	72	12	155±5	175±3	82±2	112±2	112±2
	96	10	167±6	185±6	165±15	135±3	135±3
5×10 <sup>3</sup>	24	20	90±4	87±5	47±2	45±3	45±3
	48	15	137±7	115±5	82±6	92±2	75±3
	60	12	142±11	142±8	110±4	117±5	100±4
	72	15	147±5	162±2	110±4	117±5	112±2
	96	12	190±6	192±2	147±5	135±6	195±6

При сравнительном изучении электрофоретической подвижности белков ЕС-антигена и коммерческого соматического антигена (Белорусского НИИЭМ), стандартизированных по количественному содержанию белка (400 мкг/мл), были отмечены существенные различия в качественном содержании их. В ЕС-антигене были обнаружены 3 электрофоретически различающиеся фракции, одна из которых представлена минорным компонентом. В соматическом коммерческом антигене было выявлено 18 белковых компонентов. Следует отметить, что все электрофоретически различающиеся белки ЕС-антигена были выявлены и в соматическом антигене, что свидетельствует об их общей природе. В то же время меньшее содержание белковых фракций в ЕС-антигене могло указывать на его большую антигенную специфичность.

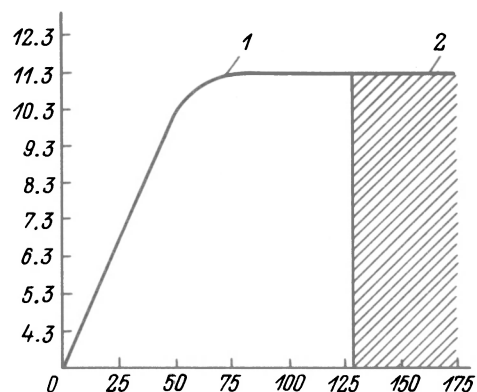
При изучении адсорбционной активности ЕС-антигена была определена его способность сенсibilизировать 1.25%-ную суспензию формализированных и танализированных эритроцитов барана. Степень сенсibilизации эритроцитов определялась в РНГА при использовании в качестве антител сыворотки крови больного трихинеллезом (см. рисунок). Было показано, что ЕС-антиген эффективно сенсibilизирует эритроциты барана в дозе 75—125 мкг/мл. Эти данные свидетельствуют о том, что любая из доз, лежащая в указанном диапазоне, может быть использована для приготовления эритроцитарного диагностикума, однако применение пограничных доз (75 и 125 мкг/мл) вряд ли целесообразно, так как незначительные ошибки в определении концентрации белка в культуральной жидкости могут привести или к снижению чувствительности метода (доза менее 75 мкг/мл), или к спонтанной агглютинации эритроцитов (доза более 125 мкг/мл). Таким образом, оптимальной для приготовления эритроцитарного трихинеллезного диагностикума является доза 100 мкг/мл ЕС-антигена. Об эффективности этой дозы свидетельствует также накопленный нами опыт приготовления эритроцитарного диагностикума для РНГА.

В результате проведенных исследований показано, что методы культивирования (поддержания) мышечных личинок трихинелл в искусственных питательных средах могут быть использованы для получения трихинеллезного ЕС-антигена. Этот антиген трихинелл содержит меньшее количество белковых фракций по сравнению с соматическим антигеном, что согласуется с ранее опубликованными данными о большей специфичности метаболических (ЕС) антигенов (Бессонов, 1975). В последнее время получены сведения, что строго специфичные для трихинелл антигенные детерминанты присутствуют в экскреторно-секреторных антигенах, полученных при культивировании личинок трихинелл *in vitro* (Gamble, Graham, 1984). Использование предлагаемых растворов для культивирования (поддержания) трихинелл, которые по своему составу могут быть отнесены к «голодным» питательным средам, применение инсулина и, наконец, значительное снижение дозы вносимых в среду культивирования

Зависимость эффективности РНГА от сенсibilизирующей дозы антигена.

По оси абсцисс — сенсibilизирующая доза антигена, в мкг/мл; по оси ординат —  $\log_2$  обратного титра антител. 1 — РНГА; 2 — зона спонтанной агглютинации.

Dependence of the reaction efficiency of indirect haemoagglutination on the sensitizing dosage of antigen.



трихинелл по сравнению с ранее предлагавшимися (Ермолин, 1967) позволяют получать ЕС-антиген трихинелл в больших количествах, а возможность его эффективного использования для приготовления твердофазных иммуносорбентов позволит повысить чувствительность и специфичность серологических методов диагностики трихинеллеза.

#### Список литературы

- Бессонов А. С. Диагностика трихинеллеза. Вильнюс: Минтис, 1975. С. 42—45.  
Васерин Ю. И., Костецкий А. Ф. Внутриштаммовая гетерогенность *Trichinella spiralis*: седиментационный анализ // Паразитология. 1989а. Т. 23, вып. 1. С. 68—70.  
Васерин Ю. И., Костецкий А. Ф. Способ получения культурального антигена из *Trichinella spiralis* (А. с. 1493260 СССР) // Бюл. «Открытия и изобретения в СССР». 1989б.  
Ермолин Г. А. Иммунохимическое изучение антигенной структуры декапсулированных личинок *Trichinella spiralis*: / Автореф. дис. . . канд. биол. наук. М., 1967. 22 с.  
Костецкий А. Ф., Васерин Ю. И. Сравнительная характеристика чувствительности и специфичности РНГА с культуральным и коммерческим трихинеллезными антигенами // Матер. 5-й Всесоюз. конф. по проблеме трихинеллеза человека и животных. М., 1988. С. 90—91.  
Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунохимия. М., 1968. С. 662—664.  
Полетаева О. Г., Красовская Н. Н., Глаголева В. А. Характеристика иммуноферментной тест-системы с антигенами трихинелл // Мед. паразитол. 1986. № 3. С. 51—56.  
Такач Б. Электрофорез белков в пластинках полиакриламидного геля // Методы исследований в иммунологии. М.: Мир, 1981. С. 95—119.  
Gamble H. R., Graham C. E. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis // Amer. J. Vet. Res. 1984. Vol. 45, N 1. P. 67—74.

НИИ эпидемиологии и микробиологии,  
Ростов-на-Дону

Поступила 19.09.1989,  
после доработки 25.04.1991

---

#### SOLUBLE METABOLIC ANTIGENS OF *TRICHINELLA SPIRALIS*: PRODUCTION AND CHARACTERISTIC

A. F. Kostetsky, Yu. I. Vaserin

*Key words:* *Trichinella spiralis*, soluble metabolic antigens

#### SUMMARY

Cultivation of *Trichinella* muscular larvae, purified by centrifugation in 20 . . . 50 % saccharose density gradient, in protein — free nutrient media at a dosage of  $3.5-4 \cdot 10^3$  lar./ml in the presence of insulin has made it possible to obtain a soluble antigen of *Trichinella*. It has been shown by means of electrophoresis in polyacrilamid gel that the soluble (secretory-excretory) antigen has three protein fractions while the somatic trichinnellous antigen has 18 fractions. It has been shown that the soluble (secretory-excretory) antigen can be used for immobilization of erythrocytes on the surface that enables the sensitivity and specificity of serological methods for diagnosis of trichinellosis to be increased.