



УДК 616.995.122.21-078.33

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИГЕНОВ ОПИСТОРХОВ

С.Н. Боровиков,¹ М.А. Куйбазаров,¹ Ж.А. Сураншиев,¹ Д.А. Баешева,²
С.К. Атыгаева,³ А.С. Халикова¹

Nicsb_katu@mail.ru

¹НИИ биотехнологии АО «Казахский агротехнический университет
им. С. Сейфуллина, г. Астана

²АО «Медицинский Университет Астана», г. Астана

³ГУ «Городская инфекционная больница», г. Астана

Отработаны два простых и эффективных способа получения антигенов из марит *Opisthorchis felineus*. Изучен их белковый состав, молекулярная масса и определены сероактивные фракции антигенов.

Апробация полученных антигенов в ИФА в сравнении с коммерческими аналогами установила их активность по отношению к специфическим антителам класса IgG сывороток крови человека, что позволяет сделать предположение о возможности их использования в разработке теста для диагностики этой инвазии. При этом наиболее перспективным является экскреторно-секреторный антиген *Opisthorchis felineus*.

Введение

Широкое распространение описторхоза в некоторых регионах Республики Казахстан (особенно в бассейне реки Иртыш) создает постоянную угрозу здоровью населения. Заболеваемость людей в Казахстане этой инвазией является одной из самых высоких среди стран СНГ [1]. В последние годы были разработаны достаточно чувствительные методы диагностики описторхоза, в частности иммуноферментный анализ. Однако при использовании в тест-системах многокомпонентных соматических антигенов трематод были отмечены ложноположительные реакции у больных другими гельминтозами и у неинвазированных людей [2, 3]. Подобное обстоятельство можно объяснить наличием перекрестно-реагирующих антигенов у многих гельминтов, а также у гельминтов и их хозяев. Ввиду этого понятна необходимость использования для этих целей видоспецифических компонентов гельминтов, пригодных для иммунодиагностики описторхоза.

Целью наших исследований была отработка способов получения антигенов для серологической диагностики описторхоза.

В задачи исследований входило получение соматического (С-АГ), экскреторно-секреторного антигенов (ЭС-АГ) описторхов и изучение их иммунохимических свойств.

Материалы и методы исследований

Половозрелые мариты *Opisthorchis felineus* для проведения исследований получали путем экспериментального заражения собак рыбой (язь), пораженной метацеркариями описторхов.

Получение С-АГ проводили по способу [4]. Для этого мариты замораживали - высушивали в течение 48 часов при -70°C. Полученный в результате препарат сухих гельминтов растирали в мелкий порошок, ресуспендировали в забуференном физиологическом растворе (1:10). После центрифугирования супернатант фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм (Millipore) и использовали в качестве соматического антигена (С-АГ).

Экскреторно-секреторный антиген готовили по способу [5] с небольшими изменениями. Для этого живые мариты описторхов, взятые из желчных ходов печени



экспериментально зараженных собак после отмычки физиологическим раствором, культивировали в неполной среде Игла с содержанием антибиотиков при температуре 37°C (5% CO₂) в течение 24 часов. После этого переносили на матрас со свежей средой Игла, содержащей антибиотики, и инкубировали дополнительно 72 часа. Полученную культуральную среду очищали центрифугированием и фильтрацией через мембранные фильтры (0,45 мкм, Millipore) и использовали в качестве экскреторно-секреторного антигена (ЭС-АГ).

Для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) ячейки 96-луночного планшета для иммунологических реакций сенсibiliзировали антигенами на карбонат-бикарбонатном буфере (КББ) pH 9,5 в различных концентрациях (5-10 мкг/мл), при 4°C в течение ночи. После этого вносили исследуемую сыворотку крови в разведении, инкубировали при 37°C в течение 60 минут. Постановку реакции осуществляли в стандартном варианте. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (ASYS Expert 96) при длине волны 492 нм.

Электрофорез проводили в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по методу J. Laemmli et al. [6], на аппарате для вертикального электрофореза *Compact dual mini code*. Определение молекулярных масс белковых фракций проводили на гельдокументирующей системе BioSart.

Постановку иммуноблотинга осуществляли путем полусухого переноса разделенных антигенов из геля на нитроцеллюлозную мембрану с помощью прибора для иммуноблотинга Semi Dry blot с последующим иммунохимическим проявлением нитроцеллюлозных реплик.

Определение концентрации белков проводили по методу M. Bradford [7].

Результаты и обсуждение

В результате исследований в печени и желчевыводящих протоках каждой из экс-

периментально зараженных собак было обнаружено от 30 до 500 марит гельминтов вида *Opistorchis felineus* (общее количество более 2000 экз.), которые были использованы для получения антигенов.

Путем экстракции из марит описторхов был получен соматический антиген с концентрацией белка – 1000 мкг/мл и изучены его свойства. В результате электрофоретического фракционирования в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия был получен «белковый профиль», представленный на рисунке 1. Окрашивание белковых полос осуществляли с помощью красителя Кумасси R-250.

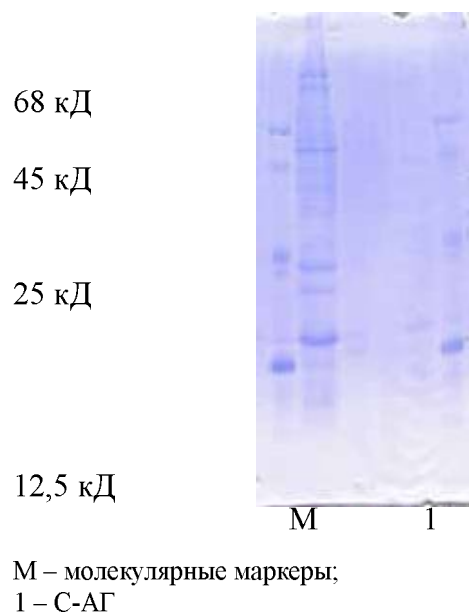


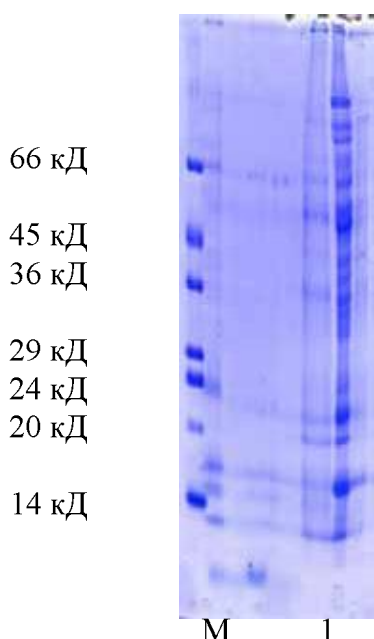
Рис.1. Результаты электрофоретического разделения соматического антигена

Анализ электрофореграммы показал наличие в составе соматического антигена 16 основных белковых фракций с молекулярными массами: 103, 94, 89, 82, 75, 63, 55, 44, 36, 32, 30, 29, 26, 24, 22, 15 кД.

Для получения экскреторно-секреторного антигена живые мариты описторхов культивировали в неполной среде Игла в течение 72 часов. После сбора культуральной жидкости и очистки антигенов изучали их основные свойства. Концентрация белка в полученном ЭС-АГ составляла 15-30 мкг/мл. В результате электрофоретического разделения в составе ЭС-АГ было выявлено 10



белковых фракций с молекулярными массами: 106, 88, 82, 73, 66, 23, 17, 15, 12, 8 кД (рис. 2).



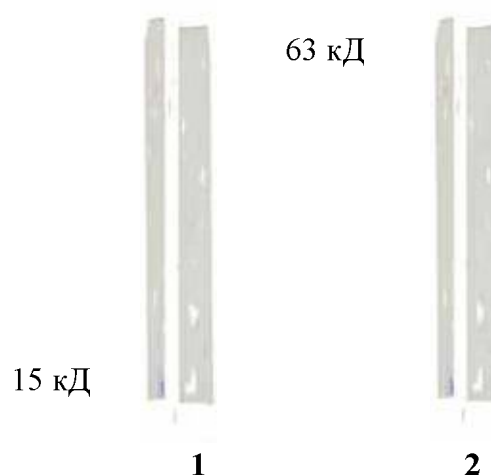
М – молекулярные маркеры; 1 – ЭС-АГ

Рис. 2. Результаты электрофоретического разделения экскреторно-секреторного антигена

Анализ электрофоретического разделения соматического и экскреторно-секреторного антигенов описторхов показали их сложный белковый состав и в целом соответствовали описаниям спектра полипептидов аналогичных комплексов, изученных другими исследователями [5]. Следует отметить наличие 2-х общих белков (82 и 15кД), содержащихся в составе изучаемых антигенов.

Изучение активности полученных антигенов по отношению к иммунным сывороткам проводили в непрямом варианте иммуноферментного анализа, в результате установлено взаимодействие соматического и экскреторно-секреторного антигенов описторхов с использованными сыворотками. При этом более четкая картина и практическое отсутствие фона наблюдалось при использовании ЭС-АГ, что вероятно, можно объяснить меньшим количеством белков в его составе.

Для определения диагностической ценности каждой из белковых фракций, входящих в состав соматического антигена, проводили иммуноблотинг с использованием позитивных сывороток крови. В качестве источника специфических антител использовали сыворотки крови экспериментально зараженных собак, в печени и желчном пузыре которых были обнаружены мариты гельминтов и сыворотки крови людей с подтвержденным диагнозом – описторхоз (рис. 3).



1 – сыворотка крови человека;
2 – сыворотка крови собаки

Рис. 3. Результаты иммуноблотинга соматического антигена

В результате исследования было выявлено, что в составе соматического антигена в реакцию с иммуноглобулинами сыворотки крови человека вступает белковая фракция антигена с молекулярной массой 15 кД. В реакции с сывороткой крови собак определена сероактивная фракция антигена с молекулярной массой 63 кД.

Для определения диагностической ценности полученных антигенов и возможности их использования в дальнейшей работе были исследованы 10 проб сывороток крови людей с подтвержденным диагнозом – описторхоз и 1 проба сыворотки крови от человека с диагнозом – эхинококкоз. Все пробы были исследованы в иммуноферментном анализе с использованием коммерческих иммуноферментных тест-систем для серо-



логической диагностики описторхоза человека производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия). Тест-системы этого производителя были использованы в 3-х вариантах:

- Описторх-IgG – ИФА – БЕСТ (выявление специфических IgG);
- Описторх-IgM – ИФА – БЕСТ (выявление специфических IgM);
- Описторх-ЦИК – ИФА – БЕСТ (выявление циркулирующих в крови специфических иммунных комплексов).

Постановку иммуноферментного анализа проводили согласно инструкции по применению тест-систем.

Параллельно все пробы были исследованы в иммуноферментном анализе с использованием в качестве иммуносорбента полистироловых планшетов, лунки которых были сенсibilизированы полученными экскреторно-секреторным и соматическим антигенами *Opisthorchis felinus*. Сыворотку крови использовали в разведении 1:100. В реакции использовали антивидовой пероксидазный конъюгат *Anti-Human IgG*. Проведение анализа осуществляли по стандартной методике, результаты учитывали на спектрофотометре. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты определения диагностической ценности полученных антигенов в ИФА

№ пробы	С-АГ	ЭС-АГ	Описторх-IgG-ИФА-БЕСТ	Описторх-IgM-ИФА-БЕСТ	Описторх-ЦИК-ИФА-БЕСТ
	Результаты ИФА (ОП)				
1	0.239	0.055	0.010	0.032	0.075
2	0.157	0.074	0.017	0.017	0.048
3	0.123	0.021	0.014	0.013	0.069
4	1.159	0.695	2.468	0.020	0.027
5	0.191	0.075	0.017	0.024	0.033
6	0.577	0.405	0.977	0.030	0.020
7	0.350	0.274	0.110	0.075	0.086
8	0.001	0.090	0.012	0.016	0.046
9	0.186	0.094	0.022	0.040	0.069
10	0.171	0.076	0.063	0.014	0.040
II (эхинококкоз)	0.191	0.079	0.042	0.027	0.035

Как следует из таблицы, с помощью коммерческих тест-систем были выявлены 2 пробы сывороток крови (№4 и 6), содержащие антитела класса IgG, специфичные к антигенам описторхов. Наивысший титр специфических антител был зафиксирован при исследовании пробы №4. Следует отметить, что эта проба, в отличие от других, была взята от пациента сразу после постановки диагноза и не прошедшего курса лечения. Эти же пробы были позитивны в ИФА и при использовании полученных нами антигенов. При этом дополнительно были определены две положительные пробы при использовании соматического антигена (№1 и 7) и одна проба с экскреторно-секреторным антигеном (№7). Однако в этих случаях оптическая плотность по данным

спектрофотометра была существенно ниже. Наличие дополнительных положительных проб, обнаруженных при использовании нашего варианта ИФА, может быть обусловлено различием белковых фракций в составе полученных нами антигенов и антигенов, использованных в коммерческих тестах. Перекрестной реакции с сывороткой крови от пациента больного эхинококкозом ни в одном из вариантов ИФА не наблюдалось.

Отдельного внимания заслуживает тот факт, что не во всех сыворотках крови от людей с подтвержденным диагнозом описторхоз были обнаружены специфические иммуноглобулины. Дело в том, что сыворотки крови были отобраны у пациентов в разные сроки течения инвазии, и в большинстве своем после проведения курса лечения.



Выводы

Таким образом, в процессе исследований отработаны два относительно простых и эффективных способа получения антигенов из марит *Opisthorchis felineus*. Изучен их белковый состав, молекулярная масса и определены сероактивные фракции антигенов.

Тестирование соматического и экскреторно-секреторного антигенов в иммуноферментном анализе в сравнении с

коммерческими аналогами установило их активность по отношению к специфическим антителам класса IgG сывороток крови человека. При этом наиболее перспективным для использования в ИФА является экскреторно-секреторный антиген *Opisthorchis felineus*.

Полученные данные позволяют сделать предположение о возможности использования выделенных антигенов в разработке тест-системы для диагностики этой инвазии.

Литература

1. Сидоров Е.Г. Паразиты промысловых рыб Казахстана. – Алматы: Бастау, 2008. – 100 с.
2. Гицу Г.А., Нгуен Тхи Хой, Баллад Н.Е., Ха Вьет Вьен, Киеу Тунг Лэм, Иващенко Е.А. Эффективность иммуноферментного теста с гомологичным и гетерологичным антигенами при клонорхозе // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - N4. - 1991. - С. 20-23.
3. Sirisinha S., Chawengkirttikul R., Tayapiwatana C., Naiyanetr C., Waikagul J., Radomyos P. and Podoprigora G.I. Specific and cross-reactive monoclonal antibodies to the 89-kDa antigen of *Opisthorchis viverrini*. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. – 1992. - vol. 23. - N3. - p. 489-490.
4. Oldham G., Williams L. Cell mediated immunity to liver fluke antigens during experimental *Fasciola hepatica* infection of cattle. Parasite Immunol. – 1985. - V.7. - P.503-516.
5. Котелкин А.Т., Разумов И.А., Покровская И.В., Локтев В.Б. Сравнительное изучение соматического, экскреторно-секреторного и яичного антигенов *Opisthorchis felineus* // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - №1. - 1997. - С. 12-16.
6. Laemmli V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature (London). – 1970. - Vol. 227. - P. 680-685.
7. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 72. - №4. – P. 248-254.

Түйін

Opisthorchis felineus мариталарының антигендерін алудың екі қарапайым және тиімді тәсілі анықталды. Олардың белок құрамы, молекулалық салмақтары мен антигендерінің серологиялық белсенді фракциялары зерттелді.

Алынған антигендердің белсенділігі ИФА әдісінде коммерциялық аналогпен салыстыра отыра тексерілді. Зерттеу нәтижесінде аталмыш антигеннің адам қан сарысуы құрамындағы IgG класына жататын тәлімді антиденелерді анықтауға мүмкіндік беретіндігі айқындалып, оларды осы инвазияны балауға арналған тест-жүйесін әзірлеуге болады депген болжам жасауға болады. Бұл жағдайда перспективті антиген болып, *Opisthorchis felineus*-тің экскреторлы-секреторлық антигені табылады.

Summary

Two simple and effective methods of obtaining antigens from *Opisthorchis felineus* were worked through. Their protein composition and molecular weight were studied. Seroactive fraction antigens were identified.

Their activity in relation to specific IgG antibodies of human blood serum was set with approbation of derived antigens in ELISA comparing with commercial counterparts. It allows making suggestion about the possibility of their use in test development for diagnosis of this invasion. Excretory-secretory antigen of *Opisthorchis felineus* is the most perspective one.