Трипаносомные антигены и сыворотки Antigens and sera for tripanosomosis

Георгиу Христофис / Georgiou Ch.
д. биол. наук, заведующий
лабораторией протозоологии,
ФГБНУ "Всероссийский научно-
исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии
имени Я.П. Коваленко",
г. Москва,
Chgeorgiou@rambler.ru

DOI 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-4-7

УДК 619.616.07.636.1

Ключевые слова: трипаносомоз, инвазия, паразитизм, антиген, экзоантиген, РДСК, РНГА, ИФА.

Key words: protozoan diseases; tripanosomosis; antigen, exoantigen, ICFT, IHAT, ELISA.

Резюме. Проведенные впервые исследования показали, что кроме соматических антигенов и экзоантигенов, полученных из крови зараженных собак, мышей или крыс с активностью 95-97%, можно использовать эритроцитарные ДНК-содержащие антигены *T. equiperdum* и *T. evansi*, полученные после трёх кратного введения мышам и кроликам смеси из трипаносомного антигена с добавлением 1,0 мл адьюванта (гидрогиса алюминия) и обескровливания животных после 25-30 дня. В результате исследований впервые был отработан способ получения положительных сывороток из плазмы крови трёхкратно иммунизированных животных, которая образуется после первого центрифугирования и удаления осадка. В результате исследований впервые был отработан способ получения положительных и отрицательных сывороток крови от зараженных *T. equiperdum* и *T. evansi* лошадей и кроликов, от лошадей паразитоносителей и иммунизированных кроликов в тот момент, когда специфические антитела в РДСК находятся в титрах 1:20 и выше, в РНГА и ИФА не ниже 1:400. Для приготовления отрицательных сывороток можно использовать только кровь от здоровых животных, отрицательно реагирующих на трипаносомоз. Приготовленные нами тест системы РДСК, РНГА и ИФА с антигенами, содержащими и не содержащими ДНК *T. equiperdum* и *T. evansi* привели к созданию универсальной тест-системы (РНГА) для дифференциации этих видов трипаносом.

Summary. Our research first revealed that apart from somatic and exoantigen with the activity of 95-97%, from infected dogs, mice or rats, you can use Packed red cellsto DNA-containing antigens of *T. equiperdum* and *T. evansi*, obtained after three times administration to mice and rabbits AG trypanosomes + 1.0 ml AGA (adjuvant: aluminium hydrogel) and bleeding only after 25-30 days. As a result of the research, the method of obtaining positive sera from blood plasma of triple immunized animals, which is formed after the first centrifugation and sediment removal, was worked out for the first time.

The studies were first worked out a method of obtaining positive and negative serum samples from infected *T. evansi* and *T. equiperdum* of horses and rabbits, the horses of the parasite and immunized rabbits at a time when specific antibodies in ICFT located in titers 1:20 and above, IHAT and ELISA not less than 1:400. To prepare negative serum you can use only the blood from healthy animals negative reaction in trypanosomiasis. Our studies for the first time showed that in addition to somatic and exantigenes with an activity of 95-97%,

from infected dogs, mice or rats, it is possible to use erythrocyte DNAs containing *T. equiperdum* and *T. evansi* antigens obtained after three fold administration to mice and rabbits AH trypanosomal + 1.0 ml of AHA (adjuvant: hydroshut of aluminum) and bleeding after only 25-30 days.

For the production of positive trypanosomiasis serums, it is necessary to take blood from infected horses and rabbits, from horses of parasites and immunized rabbits at a time when specific antibodies in the ICFT are in titres 1:20 and higher, in IHAT and ELISA not lower than 1: 400. For the preparation of negative sera, only blood from healthy animals that react negatively to trypanosomiasis can be used. Our test of the system of ICFT, IHAT and ELISA with DNA containing and not containing *T. equiperdum* and *T. evansi* antigens led to the creation of a universal test system (IHAT) for the differentiation of these trypanosomes.

Сокращения: ИНАН - инфекционная анемия, ИФА - иммуноферментный анализ, МЭБ - Международное эпизоотическое бюро, РДСК - реакция длительного связывания комплемента, РНГА - реакция непрямой гемагглютинации, РСК - реакция связывания комплемента, МЕМ - международная единица мутности, МТ - масса тела.

Введение

Трипаносомы - одноклеточные простейшие жгутиковые паразиты класса кинетопластид. На территории России встречаются возбудители случайной болезни однокопытных (*T. equiperdum*) и суры лошадей и верблюдов (*T. evansi*).

По данным МЭБ случайную болезнь, вызываемую *Trypanosoma equiperdum*, регистрируют в Южной Африке, на юге Западной Европы, в Южной Америке, КНР, Среднем Востоке, Средней Азии (Киргизии, Узбекистане) и в России (Сибири). У лошадей случайная болезнь протекает наиболее тяжело с высоким уровнем смертности (30...50 %) [12, 13, 15, 17, 19, 20].

T. evansi широко распространена в Азии, Северной Африке, Центральной и Южной Америке. К ней восприимчивы большинство видов домашних и многие виды диких животных. У непривитых лошадей и верблюдов вызываемая этой трипаносомой болезнь суры (су-ауру), как правило, заканчивается летально [12, 14, 16, 18].

По международным правилам, ввоз лошадей из неблагополучных по случайной болезни стран разрешен только при условии исключения у них данного трипаносомоза. С этой целью в основном применяют серологические тесты (чаще реакцию связывания комплемента и дополнительно иммуноферментный анализ), микроскопию и биопробу на лабораторных животных. При проведении диагностических исследований особую сложность представляет видовая дифференциация *T. equiperdum* и *T. evansi*, поскольку они неразличимы морфологически, имеют перекрестно реагирующие антигены и многочисленные сходные участки генома [1, 4, 9, 11, 19, 20].

В некоторых лабораториях в качестве дополнительно-го подтверждающего теста используют ПЦР с праймерами к гену RoTat1.2 VSG, гену субъединицы 5 NADH дегидрогеназы (nad5) и другим участкам кинетопласта [3]. Однако эти праймеры позволяют установить лишь принадлежность подвиду *Trypanozoon* меньшей мере, трех видов: *T. equiperdum*, *T. brucei* и *T. evansi* [1, 3, 4, 6]. До сих пор никому не удалось создать универсальную тест-систему для дифференциации этих видов трипаносом методом ПЦР.

В настоящее время методы молекулярной диагностики пока не нашли широкого применения для диагностики трипаносомозов животных. Ими пользуются преимущественно в исследовательских целях. ПЦР позволяет установить принадлежность к подвиду *Trypanozoon* без видовой дифференциации по меньшей мере трех видов трипаносом - *T. equiperdum*, *T. brucei* и *T. evansi* [2, 3, 5, 6, 8, 12]. С этой целью используют праймеры к области RoTat1.2 генов VSG [5], гену субъединицы 5 NADH дегидрогеназы (nad5) [8] и другим участкам кинетопласта [6]. Однако дифференциро-

Рис. 1 Дендрограмма фрагмента в 410 н.п. из области миникольцакинетоласта, построенная методом ближайшего соседа с повторной выборкой $n=1000$ в бутстрепном анализе в программе Mega 4.

щих лошадей.

Цель исследования - получения эритроцитарные с ДНК содержащими и не содержащими антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi* которые в дальнейшем, могут быть использованы в серологических реакциях, таких как РДСК (РСК), РНГА и ИФА для создания универсальную тест систему для дифференциации этих видов трипаносом (*T. equiperdum* от *T. evansi*).

Материалы и методы

Научные исследования выполнялись на базе существующей в институте лаборатории протозоологии, Вышневолоцкого филиала ФГБНУ ВИЭВ, а также животноводческих хозяйств из России и других стран с использованием клинических, микроскопических, гематологических, паразитологических, молекулярно-биологических, серологических методов с соответствиями с: Методическими рекомендациями для серологической диагностики случной болезни лошадей с применением экзоантигенов *T. equiperdum* в ИФА (2006), Методическими рекомендациями по диагностике трипаносомозов лошадей (*T. equiperdum* и *T. evansi*) в РНГА (2009), Методическим рекомендациям по серологической диагностики случной болезни лошадей с применением экзоантигенов *T. equiperdum* в иммуноферментном анализе (2011), Временным наставлением по применению набора компонентов для диагностики анаплазмоза рогатого скота в РДСК (1997), Способом получения трипаносомного антигена для серологической диагностики у животных (патент на изобретение RU 2327169 20.07.2006), и современного оборудования: микроскопы Olympus.

BX53 и CARLZEISS, низкотемпературный холодильник HAIER, INDESIT, универсальный водный термостат BWT-UBIOSAN, весы GX200, термостат MIR 262 и центрифуга MPW-380 - с вентиляцией, ИФА-ридер, термостатируемый шейкер.

Получены ДНК содержащие и не содержащие *T. equiperdum* и *T. evansi* антигены и эритроцитарные с ДНК-содержащими антигенами и положительные и отрицательные сыворотки обоих видов трипаносом.

Сублимационное высушивание приготовленных серий позитивных сывороток проводили в ФГБНУ ВИЭВ в лаборатории ихтиопатологии без защитной среды.

РДСК ставили согласно "Времен-

ному наставлению по применению набора компонентов для диагностики анаплазмоза рогатого скота в РДСК"; РНГА - согласно "Методическим рекомендациям по диагностике трипаносомозов лошадей (*T. equiperdum* и *T. evansi*); ИФА - согласно "Методическим рекомендациям по диагностике трипаносомозов лошадей (*T. equiperdum* и *T. evansi*).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных нами исследований, установлено, что объектом исследования были лиофильно высушенные трипаносомные с ДНК содержащими и белковыми компонентами и высокими титрами антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi* (табл. 1).

Опыты показали, что присутствие и отсутствие ДНК в исследуемых проб антигенов, не влияет на белковые компоненты и на титры антигенов. У всех исследуемых проб титры антигенов были в высоких титрах от 1:32 до 1:64. В дальнейшем, эти антигены могут быть использованы в серологических реакциях, таких как РДСК (РСК), РНГА и ИФА с целью создать универсальную тест систему для дифференциации этих видов трипаносом (*T. equiperdum* и *T. evansi*).

Кроме выше описанных антигенов мы использовали и эритроцитарные с ДНК содержащими антигенами *T. equiperdum* (13 и 14 табл. 1) и *T. evansi* (55 табл.1) полученные после трёх кратного введения мышам и кроликам АГ трипаносомного + 1,0 мл АГА (адьювант: гидрогисс алюминий) и только обескровливания после 25-30 дней.

Способ заключается в том, что полученную после обескровливания кровь из зараженных мышей или кроликов с последующей 2-3-кратной отмывкой их с помощью центрифугирования, разрушения путем 2-3-кратного замораживания и оттаивания, концентрированием полученного материала и титрацией его в РДСК с положительными и отрицательными сыворотками.

Таким образом получали эритроцитарный антиген. После трёх кратного введения мышам и кроликам трипаносомный антиген для серологической диагностики в РДСК случной болезни и суры (су-ауру). Надосадочную жидкость, которая образуется после первого центрифугирования лизированных эритроцитов, обрабатывали 20-25% раствором полиэтиленгликоля, взятого в равном объеме, после чего полученную смесь оставляли при комнатной температуре на 12-15 мин, повторно центрифугировали при 6000 об/мин 15-20 мин, затем надосадочную жидкость удаляли, а полученный осадок использовали как трипаносомный антиген в серологических реакциях.

Плазму крови трёхкратно иммунизированных животных, которая образуется после первого центрифугирования и удаления осадка обрабатывали 20-25% раствором полиэтиленгликоля, взятого в равном объеме с плазмой крови мышей и кроликов, после чего полученную смесь оставляют при комнатной температуре на 12-15 мин, повторно центрифугируют при 6000 об/мин 15-20 мин, затем

Рис. 2 Дендрограмма фрагмента в 724 н.п. (см. описание к рис. 1).

надосадочную жидкость удаляют, а полученный осадок используют как трипаносомный эритроцитный антиген в серологических реакциях.

В дальнейшем содержащими и с ДНК не содержащими антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi* приготовлены тест-системы РДСК, РНГА и ИФА (наборы компонентов) для диагностики трипаносомозов. Эти тест-системы использовали для мониторинга эпизоотической ситуации по случайной болезни на территории РФ, для титрования изготовленных позитивных и негативных сывороток крови лошадей, кроликов, верблюдов, козлов и зебр.

Для изготовления позитивных трипаносомных сывороток необходимо брать кровь от зараженных лошадей и кроликов, от лошадей паразитоносителей и иммунизированных кроликов в тот момент, когда специфические антитела в РДСК находятся в титрах 1:20 и выше, в РНГА и ИФА не ниже 1:400 (табл. 2). Для приготовления негативной сыворотки можно использовать только кровь от здоровых животных (табл. 2).

Как видно из табл. 2, позитивные серии сывороток были активными и не антикомплемментарными. Негативные сыворотки были отрицательными и не антикомплемментарными в РДСК, РНГА и ИФА.

Опыты по получению позитивной сыворотки от зараженных *T. equiperdum* и *T. evansi* лошадей и кроликов, от лошадей паразитоносителей иммунизированных кроликов показали, что кровь для приготовления позитивной сыворотки можно брать, когда антитела в РДСК находятся в титрах 1:20, в РНГА и ИФА не ниже 1:400. Негативной - когда сыворотка крови лошадей отрицательно реагирует в РДСК, РНГА и ИФА с антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi*.

При исследовании положительно реагирующих на случайную болезнь сывороток с *T. evansi* антигеном давали отрицательный результат (табл. 3) и наоборот давали положительно при исследовании их на антиген *T. equiperdum*.

В дальнейшем антигены, позитивные и негативные сыворотки крови лошадей с целью длительного хранения высушивали. После высушивания сыворотки разводили в 1 мл физиологического раствора и вновь титровали в сравнении с негативными с высушенными антигенами. Высушенные антигены, положительные и отрицательными сыворотки крови сохранили свою активность и не были антикомплемментарными.

Заключение

Наши исследования впервые показали, что кроме соматических и эритроцитных антигенов можно использовать и эритроцитные с ДНК содержащими антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi*, полученные после трёх кратного введения мышам и кроликам АГ трипаносомного + 1,0 мл АГА (адьювант: гидрогисс алюминий) и обескровливания только после 25-30 дней. В результате исследований впервые был отработан способ получения положительных сывороток от плазмы крови трёхкратно иммунизированных животных, которая образуется после первого центрифугирования и удаления осадка.

В результате исследований впервые был отработан способ получения положительных и отрицательных сывороток крови от зараженных *T. equiperdum* и *T. evansi* лошадей и кроликов, от лошадей паразитоносителей иммунизированных кроликов. Опыты показали, что кровь для приготовления позитивной сыворотки можно брать, когда антитела в РДСК находятся в титрах 1:20, в РНГА и ИФА не ниже 1:400. Негативной - когда сыворотка крови лошадей отрицательно реагирует в РДСК, РНГА и ИФА с антигенами *T. equiperdum* и *T. evansi*.

Приготовленные нами тест-системы РДСК, РНГА и ИФА с ДНК - содержащими и не содержащими *T. equiperdum* и *T. evansi* антигенами привели к созданию универсальной тест-системы (РНГА) для дифференциации этих видов трипаносом. Полученные результаты могут быть рекомендованы для получения положительных и отрицательных сывороток

и антигенов и для создания универсальной тест-системы (РНГА) для дифференциации этих видов трипаносом *T. equiperdum* от *T. evansi*. Исследования имеют большое экономическое значение. С их помощью можно различать *T. equiperdum* от *T. evansi* и положительно реагирующих на суру животных лечить, продавать и использовать как здоровых лошадей.

Литература

1. Василевич, Ф.И. Практическое руководство по борьбе с кровепаразитарными болезнями домашних животных / Ф.И. Василевич, Х. Георгиу, В.В. Белименко, М.И. Гулюкин - М.: ЗооВетКнига, 2015. - 86 с.
2. Георгиу, Х. ИФА для диагностики трипаносомоза (дурина) лошадей / Х. Георгиу // Ветеринарная патология. - 2003. - № 1. - С. 99-101.
3. Георгиу Х., Белименко В.В., Самойловская Н.А. Паразитарные болезни животных из Списка МЗБ. Монография. / Х. Георгиу, В.В. Белименко, Н.А. Самойловская - М.: Инфра-М, 2016 - 88 с.
4. Гулюкин, М.И. Кровепаразитарные болезни домашних животных / М.И. Гулюкин, В.Т. Заблоцкий, В.В. Белименко, П.И. Христиановский, А.Р. Саруханян - М.: ЗооВетКнига, 2013 - 86 с.
5. Ломакина, Н.Ф. Изучение генома возбудителей трипаносомозов лошадей (*T. equiperdum* и *T. evansi*) / Н.Ф. Ломакина, Х. Георгиу, В.Т. Заблоцкий, М.И. Гулюкин, Л. Тюрейтер // Ветеринария. - 2013. - № 3. - С. 29-33.
6. Ломакина, Н.Ф. Трудности дифференциации трипаносом *T. evansi* и *T. equiperdum* / Н.Ф. Ломакина, Х. Георгиу, М.И. Гулюкин // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Молекулярная диагностика". - Том II. - Москва. Март 2014 г. - С. 491-492.
7. Юров, К.П. Дифференциальная диагностика трипаносомозов у лошадей и филогенетический анализ возбудителя сурры (*T. evansi*) в Республике Таджикистан / К.П. Юров, С.В. Алексеев, М.И. Гулюкин, Х. Георгиу, М.А. Амирбеков, М.А. Аноятбеков, А.Н. Махмадшоев, И.Ш. Шодмонов, М.Д. Давятова, Л. Туратъе // В сборнике: Материалы VI Международного ветеринарного конгресса. - 2016. - С. 320-322.
8. Георгиу, Х. Получение высокоактивных и высокоспецифичных трипаносомных сывороток / Х. Георгиу // Ветеринария и кормление. - 2014. №1. - С. 26-28.
9. Belimenko, V.V. Prospects for the use of Geographic Information Systems for risk-based monitoring of natural focal diseases of animals and humans / V.V. Belimenko, A.M. Gulyukin // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. - 2016. - Т. 56. - № 8. - С. 22-25.
10. Belimenko, V.V. Prospects of application of geoinformational systems for veterinary geology / V.V. Belimenko, A.M. Gulyukin, E.V. Novosad, A.A. Shabeikin / Conference Materials of 7th International Conference on Medical Geology - Medgeo 2017. - 2017. - С. 61-62.
11. Claes F., Buscher P., Touratier L., Goddeeris B.M. Trypanosoma equiperdum: master of disguise or historical mistake? // Trends Parasitol. 2005. V. 21(7). P. 316 - 321.
12. Claes F., Radwanska M., Urakawa T. et al. Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of Trypanosoma evansi infections // Kinetoplastid Biol. Dis. 2004. V. 3. P. 3.
13. Clausen P.H., Chuluun S., Sodnomdarjaa R. et al. A field study to estimate the prevalence of Trypanosoma equiperdum in Mongolian horses // Vet. Parasitol. 2003. V. 115. P. 9 - 18.
14. Gulyukin, M.I. Genetic analyses for differential diagnosis of equine trypanosomoses: dourine and surra / M.I. Gulyukin, C. Georgiou, V.T. Zablotsky, N.F. Lomakina, K.P. Yurov, L. Touratier // Ветеринария и кормление. - 2015. - № 2. - С. 16-19.
15. Lai D.H., Hashimi H., Lun Z.R. et al. Adaptations of Trypanosoma brucei to gradual loss of kinetoplast DNA: Trypanosoma equiperdum and Trypanosoma evansi are petite mutants of T. brucei // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105(6). P. 1999 - 2004.
16. Li Fj, Gasser R.B., Lai D.H., Claes F. et al. HCR approach for the detection of Trypanosoma brucei and Tr. Equiperdum and their differentiation from T. evansi based on maxicircle kinetoplast DNA // Mol Cell Probes. 2007. V. 21(1). P. 1 - 7.
17. Svotina, M.A. Epizootiological characteristics of animal rabies in the West Kazakhstan region / M.A. Svotina, G.G. Absatirov, M.Sh. Shalmenov, A.A. Sidorchuk, A.M. Gulyukin // Biology and Medicine. - 2015. - Т. 7. - № 5. - P. BM-152-15.
18. Young R., Taylor J.E., Kurioka A., Becker M. et al. Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from Trypanosoma brucei gambiense, T. b. brucei and T. equiperdum // BMC Genomics. 2008. V. 9. P. 385.
19. Zablotskiy V.T., Georgiu C., De Waal T. et al. The current challenges of dourine: difficulties in differentiating Trypanosoma equiperdum within the subgenus Trypanozoon // Rev. Sci. Tech. 2003. V. 22(3). P. 1087 - 1096.
20. OIE Terrestrial Manual 2012. Chapter 2.1.17. P. 213. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.17_TRYPANO_SURRA.pdf.
21. OIE Terrestrial Manual. 2008. Chapter 2.5.3. P. 845 - 851. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.03_DOURINE.pdf.