

УДК 619:616.995.132.6-074/-076

Небещук Л.В., аспірант, (ludusichka@rambler.ru) ©

Білоцерківський національний аграрний університет

ХАРАКТЕРИСТИКА БІЛКОВОГО СКЛАДУ СОМАТИЧНОГО ТА ЕКСКРЕТОРНО-СЕКРЕТОРНОГО АНТИГЕНІВ ЛИЧИНОК *TOXOCARA CANIS*

*Отримано соматичний та екскреторно-секреторний антигени личинок *Toxocara canis*, охарактеризовано білковий склад цих антигенів. Встановлено, що імунореактивними білками соматичного антигену є протеїни, які мають молекулярну масу 30–32, 37, 46, 50, 70 та 110 kDa, екскреторно-секреторного – 47 та 70 kDa.*

Ключові слова: токсокароз, антигени *Toxocara canis*, електрофорез, імуноблотинг

Вступ. Токсокарозна інвазія м'ясоїдних характеризується наявністю 2-х фаз розвитку *T. canis*, а отже 2-х форм клінічного перебігу: міграційної та кишкової. Якщо для діагностики останньої використовують гельмінтологічні методи досліджень (флотаційні, комбіновані), то виявити міграційну форму гельмінтозу, обумовлену паразитуванням личинок токсокар, як в тканинах, так і крові хворої тварини чи людини, досить складно [1].

Одним із перспективних і високоефективних методів захиттєвої діагностики “visceral larvae migrans” є імуноферментний аналіз (тест ELISA) [2, 3]. Він дозволяє виявити в сировотці крові на ранніх стадіях інвазії чи в інших рідинах організму антитіла чи циркулюючі антигени збудника.

Чутливість та специфічність будь-якого серологічного тесту, у тому числі імуноферментного аналізу, має важливе значення і залежить, в першу чергу, від якості антигену, основного компоненту діагностичного набору для імуноферментного аналізу [4].

Наукові дослідження щодо розробки тест-систем за токсокарозна інвазії у людей свідчать про використання соматичних антигенів личинок *Toxocara canis*. При використанні цих антигенів, як повідомляють вчені, можливе виникнення перехресних реакцій, якщо в макроорганізмі паразитують і інші гельмінти.

Відомо, що інвазійні личинки токсокар в організмі живителя виділяють продукти своєї життєдіяльності (екскрети та секрети). Ці речовини також використовують, як антигени в серологічних реакціях. Їх називають екскреторно-секреторними антигенами *Toxocara canis* [5]. Використання екскреторно-секреторних антигенів личинок токсокар в ELISA дає можливість виготовляти ефективні діагностичні набори, що виявляють інвазію у тварин та людини на різних стадіях її розвитку. Антигени отримують шляхом культивування личинок токсокар у стерильних умовах на спеціальних

живильних середовищах. Продукти метаболізму, які продукують личинки *in vitro*, мають високу чутливість (92–95 %) та специфічність (73–78 %) [6].

Матеріал і методи. Матеріалом для наших досліджень були личинки *T. canis* першої стадії. Їх отримували після культивування яєць токсокар, виділених з матки статевозрілих самок, до інвазійної стадії. З метою руйнування оболонки кортикального шару яєць у пробірки, де знаходилися інвазійні яйця, вносили водний розчин хлору (14% активного хлору), а потім суспензію декортикованих яєць поміщали в гомогенізатор Поттера, в якому завершувався процес руйнування яйцевих оболонок. Для звільнення отриманої культури від яйцевих оболонок водний розчин з хлором переціджували через металеве ситечко з розміром вічок 20 мкм. Оболонки яєць затримувалися на ситечку, а очищені личинки проходили через вічка ситечка. Чисті личинки *T. canis* слугували матеріалом для виготовлення антигенів.

Соматичний антиген отримували шляхом екстрагування білків личинок токсокар протягом 16 годин при +4 °C після їх гомогенізації в 0,1 М буферному розчині *Tris-HCl* рН 8,2 з вмістом 0,01 М PMSF. Після цього гомогенат центрифугували 30 хв при 15 тис. об/хв. Надосадкову рідину використовували як антиген.

Для отримання екскреторно-секреторного антигену проводили культивування личинок токсокар першої стадії на живильному середовищі *DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)* з пеніциліном, стрептоміцином по 100 ОД/мл, а фунгізоном (5,6 мкг/мл). Концентрація личинок у живильному середовищі була 5000 екз. на 1 мл. Культивування проводили протягом 1 тижня при 37 °C в CO₂-інкубаторі з умістом 5 % CO₂.

Після закінчення інкубації личинки токсокар видаляли з середовища фільтрацією через паперовий фільтр з наступним центрифугуванням протягом 10 хв при 15 тис. об/хв. Надосадкову рідину концентрували в 100 разів під тиском через фільтри „*Nanosep 10k*“ фірми „*PALL Corporation*“ (США) з мембраною, що затримує білки молекулярною масою 10000 Da і більше.

Концентрацію білків у антигенах визначали спектрофотометром *EPENDORF* при довжині хвилі 280 нм. Отримані антигени фасували у флакони по 1 мл та зберігали при –70 °C.

Білковий склад отриманих антигенів визначали шляхом розділення їх за молекулярною масою електрофорезом в денатуруючих умовах з концентрацією поліакриламідного гелю (ПААГ) 12 % за методом *U.K. Laemmli*. Для контролю отриманих білків використовували протеїновий маркер з 7 білками молекулярною масою від 14,4 до 116 kDa („*Fermentas*“, Литва).

Імуноблот проводили за методикою, описаною Н. Towbin et al. [7]. Перенесення білків з ПААГ здійснювали на *PVDF* мембрану *Amerham Hybond-P* за допомогою спеціального модуля апарату „*Hoefler mini VE*“ (*Amerham Biosciences Corporation, USA*) упродовж 1 год за сили струму 200 мА.

Для контролю ефективності перенесення білків з ПААГ частину мембрани, на якій знаходився маркер, відрізали та фарбували фарбою *Amido Black*. Іншу частину мембрани блокували протягом 1 год при 37 °C у фосфатно-сольовому

буфері (ФСБ) з 3 % сухого знежиреного молока та 0,05 % Твіну 20, висушували та різали на смужки (стрипи).

Протягом 1 години стрипи інкубували при кімнатній температурі з позитивними та негативними на токсокароз сироватками крові, розведеними 1:100 у ФСБ з 5 % сухого знежиреного молока та 0,05 % Твіну 20. Після закінчення інкубації стрипи промивали від антитіл, що не зв'язалися.

Комплекси антиген-антитіло, які утворилися на мембрані, виявляли за допомогою кон'югату рекомбінантного білка А золотистого стафілокока, кон'югованого з колоїдним золотом. Результат реакції оцінювали візуально. У позитивному випадку на стрипах виявляли червоні смужки, які відповідали білкам антигену з тією чи іншою молекулярною масою.

Результати досліджень. Були виготовлені два антигени з личинок нематоди *Toxocara canis*: соматичний та екскреторно-секреторний. Аналіз результатів електрофорезу отриманих антигенів в ПААГ, показав, що соматичний антиген складався з ряду протеїнів з молекулярною масою від 15 до 120 kDa, однак мажорними (найбільш ефективними) були білки з молекулярною масою 27 kDa, 32, 37, 46, 50 та 70 kDa. До білкового спектру екскреторно-секреторного антигену входили протеїни, молекулярна маса яких коливалася в межах від 25 до 120 kDa. Основним компонентом екскреторно-секреторного антигену були білки з молекулярною масою 32, 37 і 70 kDa (рис. 1).

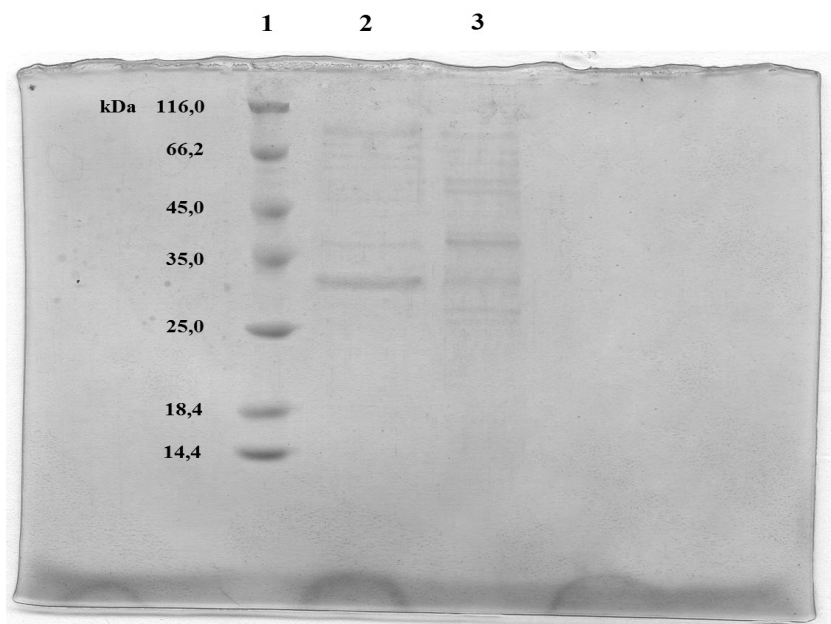


Рис. 1. Електрофорез в ПААГ антигенів личинок *T. canis*:
1 – маркер молекулярної маси білків; 2 – екскреторно-секреторний антиген; 3 – соматичний антиген

Виявлення значного спектру білків з різною молекулярною масою в екскреторно-секреторному антигені може виникати в результаті загибелі личинок токсокар під час їх культивування на живильному середовищі та вивільнення в середовище соматичних антигенів.

Дослідження в імуноблотингу соматичного антигену з позитивними сироватками крові собак, природно інвазованих токсокарами, а також отриманих від експериментально заражених та негативними сироватками крові тварин вільних від личинок токсокар, було встановлено, що екстракт із личинок *T. canis* має декілька білкових фракцій, з якими специфічно зв'язуються протитоксокарозні антитіла. Імунореактивними протеїнами даного антигену є білки, що мають молекулярну масу 30–32, 37, 46, 50, 70 і 110 kDa (рис. 2).

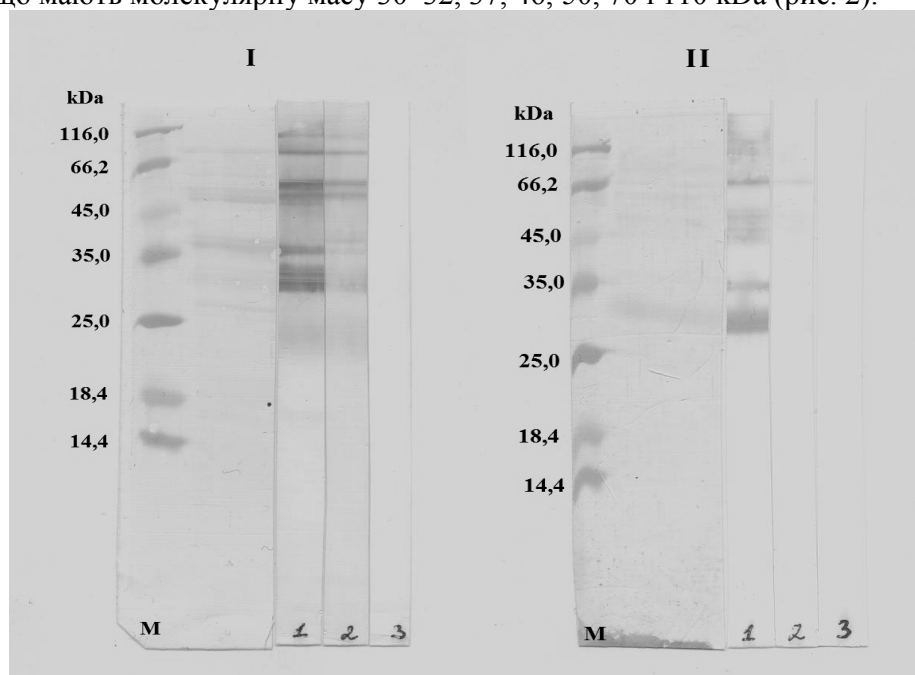


Рис. 2. Імуноблотинг з антигенами личинок *T. canis*:

I – соматичний антиген; II – екскреторно-секреторний антиген; М – маркер молекулярної маси білків; 1 – сироватка крові, отримана від собаки на 28 добу експериментальної інвазії *T. canis*; 2 – сироватка крові собаки, природньо зараженої *T. canis*; 3 – сироватка крові собаки, вільної від гельмінтів.

У екскреторно-секреторного антигену *T. canis* з позитивними сироватками крові специфічно взаємодіяв цілий спектр імунореактивних білків, які знаходилися в межах 37–120 kDa. Імунореактивність щодо антитоксокарозних антитіл мали білкові фракції з молекулярною масою 32, 37, 46–50 і 70 kDa. Однак, специфічними виявилися протеїни, що мали молекулярну масу 47 та 70 kDa. Дані компоненти екскреторно-секреторного антигену реагували з антитілами сироваток крові тварин, як експериментально заражених, так і природно інвазованих нематодами *T. canis*.

Висновки.

1. В результаті проведених досліджень нами отримано 2 антигени личинок токсокар: соматичний та екскреторно-секреторний. Визначено їх білковий склад, встановлено імунореактивність окремих білкових фракцій антигенів.

2. Імунореактивними білками соматичного антигену є протеїни, що мають молекулярну масу 30–32, 37, 46, 50, 70 та 110 kDa, екскреторно-секреторного 47 та 70 kDa.

3. Продовжується дослідження з вивчення чутливості та специфічності отриманих антигенів в імуноферментному аналізі.

Література

1. Burke T.M. Prenatal and lactational transmission of *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum* : experimental infection of the bitch before pregnancy / T.M. Burke, E.L. Roberson // *Int. J. Parasitol.* -1985 – Vol. 15. – P. 71–75.

2. Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects / D. Despommier // *Clin Microbiol Rev.* – Apr. 2003. – Vol.16. – №. 2. – P. 265–72.

3. Константинова Т.Н. Циркулирующие иммунные комплексы, общие IgE и специфические IgE-антитела у больных токсокарозом / Т.Н. Константинова // *Мед. паразитол.* – 1998. – №2. – С.32–34.

4. Lewis J. W., Maizels R. M. *Toxocara* and Toxocariasis, clinical, epidemiological and molecular perspectives / J.W. Lewis, R.M. Maizels // *British Society for Parasitology and Institute of Biology*, – 1993. – P. 49–53.

5. Savigny D. H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans / D.H. Savigny // *J. Parasitol.*, – 1975. – Vol. 61. – P. 781–782.

6. Pollard Z.F. ELISA for diagnosis of ocular toxocariasis / Z.F. Pollard, W.H. Jarrett, W.S. Hagler et al. // *Ophthalmology.* – 1979. – Vol. 86. – P. 743–749.

7. Towbin H., Staehlin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehlin, J. Gordon // *Proc. Natl. Acad. Sa. USA.* 1979. – Vol. 76. – P. 4350 – 4354.

Summary**Nebeshchuk L.****THE CHARACTERISTIC OF PROTEINS COMPOSITION OF SOMATIC AND EXCRETORY-SECRETORY ANTIGENS OF TOXOCARA CANIS LARVAE**

*The somatic and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* larvae is produced. The proteins composition of these antigens is described. It is set that the immune reactivity of somatic antigen are proteins which have molecular weight is 30–32, 37, 46, 50, 70 and 110 kDa, and excretory-secretory antigen – proteins which molecular weight 47 and 70 kDa.*

Стаття надійшла до редакції 7.04.2010