АНАЛИЗ ТИТРОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В ИФА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ АРКТИЧЕСКИМИ ИЗОЛЯТАМИ *TRICHINELLA NATIVA*

Клинков А.В., Одоевская И.М., Курносова О.П., Черкасова Е.М.
ГНУ Всероссийский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина

Введение. Известно, что в патогенезе трихинеллёза важную роль играют иммунологические реакции организма хозяина, степень выраженности которых находится в прямой зависимости от количества возбудителя болезни и его вирулентности, взаимной адаптации паразита и хозяина. Вирулентность каждого изолята трихинелл вариабельна, зависит от генетических свойств, чувствительности и восприимчивости конкретного индивида (так называемая специфическая и неспецифическая устойчивость к паразитозам).

Многие авторы отмечают, что трихинеллёз человека и животных, вызываемый природными и синантропными штаммами, имеет чёткие клинико-морфологические, паразитологические и эпидемические особенности. Биологические особенности штаммов трихинелл в значительной степени определяются степенью иммуносупрессивной активности гельминтов и уровнем защитных реакций хозяина. Представленная работа посвящена изучению специфического гуморального иммунного ответа организма хозяина на инвазию арктическими вариететами *T.nativa*, первоначально выделенными из мышц спонтанно заражённых плотоядных животных: росомахи и белого медведя.

Материалы и методы**.** Инвазионный материал – личинки *T.nativa* в мышцах плотоядных животных (белого медведя и росомахи) был любезно предоставлен сотрудниками ЯРВИЛа (Республика Саха). Белый медведь был отстрелен на территории посёлка на побережье Восточно-Сибирского моря, (в Нижнеколымском районе Якутии, граничащим с Чукоткой) в связи с его неоднократными нападениями на домашних животных, принадлежащих жителям этого населённого пункта. Росомаха являлась охотничьим трофеем, добытым в горно-таёжном Нерюнгринском районе Республики Саха.

Получение и сохранение диагностических сывороток крови.

Пробы крови отбирали в стерильные сухие пробирки в объёме не менее 1,5-2 мл от каждого животного и помещали в термостат (37ºС) на 1 час. Образовавшийся сгусток крови обводили стерильной металлической спицей или стеклянной палочкой и помещали в холодильник (+4ºС) на 1-2 часа для отстаивания сыворотки.

Условия постановки твердофазного ИФА (ELISA).

ИФА ставили в непрямом варианте, для сенсибилизации твердой фазы использовали экскреторно-секреторные антигены с молекулярной массой 29-63 кДа (1). Положительной считалась проба, оптическая плотность (ОП) которой более чем в два раза превышала показатели отрицательного контроля. Результаты ИФА оценивали на спектрофотометре 340/АТС фирмы

STL-Labsistems (Австрия) с автоматическим ридером и вертикальным лучом света при длине волны 450 нм (ОП 450).

Результаты и обсуждение. **Получение положительных и отрицательных проб сывороток крови.** В качестве доноров положительных сывороток крови были использованы экспериментально заражённых *T.nativa* (в дозе 10 личинок на грамм живого веса) 6 белых беспородных крыс (массой 160-180 г) и 40 мышей (18-20 г). Отрицательные сыворотки крови получали от выбракованных по возрасту животных из числа маточного поголовья в виварии ВИГИС.

Приготовление и определение оптимального титра антивидового пероксидазного конъюгата

Иммуноглобулины из сывороток крови мышей получали осаждением раствором сульфата аммония (50% насыщения). Полученный центрифугированием осадок иммуноглобулинов растворяли в фосфатно-солевом буфере и диализовали при 4°С в течение 16-18 часов. Для получения гипериммунных антисывороток провели иммунизацию 3- х кроликов весом 3,5-4кг. Полученные антитела конъюгировали с модифицированным перийодатом натрия ферментом (пероксидазой хрена) по методу Wilson M.P., Nakane R.K., 1978. Для титрования антивидового конъюгата готовили двукратные разведения на ФСБ начиная от 1:20 и до 1:12800, ИФА осуществляли по стандартной схеме, используя в качестве «антигена» «pull» иммуноглобулинов мышей (2). Оптимальный титр приготовленного нами антивидового конъюгата для иммуноферментного анализа сывороток крови мышей составил 1: 1200, для крыс 1: 4000 (пр-ва Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалея).

Динамика титров специфических антител в ИФР у экспериментально заражённых арктическими изолятами *T.nativa* лабораторных животных.

Убой животных (в количестве 3-х голов на каждый срок) и получение сывороток крови проводили на 30, 60 и 90 дни после заражения. В ИФР исследовались сыворотки крови мышей (1-4-й пассаж) и крыс (5 пассаж). При исследовании сывороток крови от животных, заражённых изолятом трихинелл от росомахи, специфические антитела обнаруживались в минимальном диагностическом титре (1:20; 1:40) у мышей 3-го и последующих пассажей, причём преимущественно к 60 – 90 дням инвазии. У животных 4-го и 5-го пассажей специфические антитела в минимальном диагностическом титре выявлялись к 30-45 дню инвазии, затем наблюдался их незначительный рост (титры 1:80; 1:160) к 90-120 дням инвазии. По-видимому, это связано с чрезвычайно низким потенциалом воспроизводства, и, следовательно, малой интенсивностью инвазии в мышцах ввиду слабой адаптации к лабораторным грызунам данного вариетета трихинелл.

ИФА сывороток крови от лабораторных грызунов, использованных для пассирования изолята трихинелл от белого медведя, показал следующие результаты. Специфические антитела в минимальном диагностическом титре (1:40) определяются на 30 день инвазии у крыс и мышей, достигают

максимума к 90 (ОП= 0,995-1,117) дню, и сохраняются в кровотоке на высоком уровне, вплоть до окончания эксперимента (120-150 дни) в титрах 1: 320; 1:640.

Заключение: Результаты эксперимента показывают, что иммуногенность по отношению к трихинеллам наиболее полно проявляется у тех животных, к которым адаптирован тот или иной вариетет трихинелл. Наиболее совершенная адаптация изолята трихинелл, первоначально выделенных из мышц белого медведя, к организму белых беспородных крыс и мышей, благоприятствует формированию иммунитета высокой напряжённости. Полученные данные могут быть использованы при моделировании природного трихинеллёза на лабораторных грызунах, что позволит объективно оценить протективные свойства разрабатываемых в ВИГИСе вакцин для профилактики трихинеллёза.

Литература: 1.Одоевская И.М.// Мед. пар.-2007.-№4.-С.19-24. 2. Gamble H.R., Wisnewski N., Wassom D. //American Journal of Veterinary.-1997.-58.-P.417-421.

Analysis of specific antibody titers using ELISA at experimental infection of laboratory rodents by Arctic Trichinella nativa isolate. Klinkov A.V., Odoevskaya I.M., Kurnosova O.P., Cherkasova E.M. All-Russian K.I. Skryabin Institute of Helminthology.

Summary. One investigated humoral immune response at experimental T. nativa infection in laboratory rodents. The perspectives for application of the isolate received from white bear for modelling of natural Trichinella infection and screening of agents with protective effects developed in the institute were shown.