

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) = Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2022. - №2 (113). – Ч. 2. – С. 133-145

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСКРЕТОРНО-СЕКРЕТОРНОГО И СОМАТИЧЕСКОГО АНТИГЕНОВ *TRICHINELLA SPIRALIS*

Акибеков Оркен Султанхамитович

*Кандидат ветеринарных наук, ассоциированный профессор,
Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: orken.a.s@mail.ru*

Жагинар Фариза Сабиткызы

*Магистр технических наук,
Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: fariza140292@mail.ru*

Сыздыкова Альфия Сафиоллаевна

*Магистр технических наук,
Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: halik.kz@mail.ru*

Гаджимурадова Айсарат Махмудовна

*Магистр технических наук,
Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: aisarat3878@mail.ru*

Аканова Жаннара Жұльдасовна

*Кандидат ветеринарных наук,
Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: azhzh80@mail.ru*

Аннотация

Трихинеллез по сей день представляет угрозу жизни и здоровью животных и людей. Несмотря на всю его изученность, ранняя диагностика при попадании личинок паразита внутрь организма не способна обнаружить инвазию на кишечной стадии. Иммуноферментный анализ выявляет наличие паразита на 2-4 неделю после инвазии, когда взрослые личинки могут уже капсулироваться в мышцах. Наиболее точным методом на сегодняшний день является проведение ИФА с использованием экскреторно-секреторных и

соматических антигенов. В нашем исследовании получены экскреторно-секреторные и соматические антигены к наиболее распространенному виду *Trichinella spiralis*, выделенному из туш диких животных. В результате электрофореза выявлен белковый состав ЭС-Аг, молекулярные массы которых варьируются в пределах от 45 до 100 кДа, и С-Аг с молекулярными массами от 25 до 300 кДа. В иммуноблотинге были выявлены диагностически ценные фракции экскреторно-секреторного белка 15 кДа, соматического антигена 300 кДа, вступающие в реакцию с иммуноглобулинами сыворотки крови экспериментально зараженных животных. По результатам ИФА выявлено наличие специфических антител к полученным антигенам в группе кроликов, зараженных личинками *T. spiralis*, начиная с 14 дня после заражения наблюдался выраженный рост специфических антител, однако на 70 день титр антител значительно снижался, но оставался в достаточно высоких пределах от 1:800 до 1:12 800. Таким образом, применение экскреторно-секреторного антигена позволяет определить наличие инвазии с 14-го дня после заражения.

Ключевые слова: *Trichinella spiralis*; трихинеллез; личинка; экскреторно-секреторный антиген; соматический антиген; диагностика; ИФА.

Введение

Трихинеллез является широко распространенным заболеванием для населения, особенно в развивающихся странах, но также представляет собой экономическую проблему при производстве продуктов из свинины и обеспечении безопасности пищевых продуктов. Напротив, развитые страны, как правило, имеют более низкий риск трихинеллеза, связанный с потреблением продуктов из свинины, благодаря их высоким стандартам биобезопасности и строгому ветеринарному контролю в свиноводстве и пищевой промышленности [1].

Заражение происходит при потреблении мяса животных, прошедшего недостаточную термическую обработку, при которой личинки сохраняют свою жизнеспособность. Трихинелла является одной из наиболее

распространенных внутриклеточных паразитических нематод, поражающих позвоночных [2]. Весь жизненный цикл паразита трихинеллы проходит в одном хозяине после проглатывания инфицированной мышечной ткани.

С 2012 по 2017 годы от 1 до 3 случаев заболевания среди людей выявлены в Восточно-Казахстанской, Карагандинской, Костанайской областях. В 2018 году отмечено 5 случаев заболевания людей в Костанайской области. Источником инвазии послужило употребление в пищу мяса барсука без ветеринарно-санитарной экспертизы. Все случаи подтверждены лабораторными исследованиями (ИФА). В 2019 году случаи болезни среди людей не были зарегистрированы. Благополучными по данному заболеванию с 2004 года являются

Западно-Казахстанская, Атырауская, Мангистауская и Актюбинская области [3].

Анализ заболеваемости людей трихинеллезом показал, что источником инвазии в большинстве случаев стало употребление больными в пищу мяса бродячих собак – 37 случаев (63,9%), барсуков – 10 случаев (17,2%), кабанов – 10 случаев (17,2%), волка – один случай (1,7%) [4].

Установлено, что трихинеллез распространяется неравномерно. Природные очаги трихинеллеза с участием диких животных в Казахстане представлены 8 видами диких животных - корсак, лиса, собака, медведь, рысь и др. [5].

Диагностика трихинеллеза довольно сложна, так как его клинические проявления неспецифичны. ИФА с использованием ЭС-Аг мышечных личинок *T. spiralis* является наиболее часто используемым серологическим методом для диагностики трихинеллеза [6]. Но основным недостатком определения антител к трихинеллам является возникновение высокой частоты ложноотрицательных результатов на ранней стадии инфекции, а также перекрестная реакция между ЭС-Аг *T. spiralis* и сыворотками больных другими паразитарными

Материалы и методы

Все мероприятия с участием животных выполнялись с соблюдением высоких стандартов биобезопасности и обеспечения благополучия животных. Все протоколы выполнены в

заболеваниями (например, парагонимоз, шистосомоз, клорнорхоз, цистицеркоз, анизакиоз и т. д.). IgG, специфические для *Trichinella*, не дают положительных результатов у свиней и мышей, инфицированных экспериментально, в течение 3-4 недель после заражения [7]. Инкубационный период составляет от 2 до 45 дней, а также частота и интенсивность симптомов зависят от нескольких факторов, включая виды трихинелл, вызывающих инфекцию, инфицирующую дозу и индивидуальную реакцию на паразита.

В последние десятилетия значительные усилия были направлены на разработку надежных методов серодиагностики трихинеллеза человека. Методы ELISA используются наиболее часто, но используется широкий спектр антигенов, и существует некоторая путаница в отношении того, какие антигены трихинелл наиболее подходят для серодиагностики с точки зрения чувствительности, специфичности и простоты использования [9].

Целью данного исследования была оценка потенциала экскреторно-секреторного и соматического антигенов *T. spiralis* для ранней серодиагностики острого трихинеллеза.

соответствии с Международными Руководящими принципами для биомедицинских исследований с участием животных (*International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*).

Паразиты и экспериментальные животные. Изоляты *T. spiralis*, использованные в исследовании, были получены от спонтанно зараженных диких животных и из образцов мышечной ткани свиней, экспериментально инвазированных трихинеллами, любезно предоставленными специалистом отдела диагностики, генетики и характеристики возбудителя Референтного центра по оценке риска (BfR) г. Берлина, доктором ветеринарной медицины Dr. Anne Mayer-Scholl.

Из лабораторных животных использованы кролики-самцы, порода советская шиншилла (самцы 6-8 месяцев 18 голов с живой массой по 4400-4600 г).

Сбор червей и подготовка соматических антигенов. По принципу аналогов формировали 3 группы подопытных животных. Первую и вторую группу кроликов инвазировали возбудителем трихинеллеза *T. spiralis* соответственно, в дозах 2500-3000 личинок на голову. Животных заражали путем введения per os (перорально) «перевара», содержащего личинки трихинелл. Третья группа неинвазированных животных – контрольная, которым вводили per os физиологический раствор в объеме 5 мл. Экспериментальные исследования продолжались 70 суток.

На 70-й день животные, зараженные *T. spiralis*, подвергались эвтаназии, вскрытию и исследованию на наличие в мышечной ткани паразитов в соответствии с рекомендациями ВОЗ/МЭБ [10].

Диагностику и выделение личинок возбудителя трихинеллеза из образцов мышечной ткани животных проводили методом компрессорной трихинеллоскопии и переваривания в искусственном желудочном соке (ИЖС), согласно методам МУК 4.2.2747-10 «Методы санитарно-паразитологической экспертизы мяса и мясной продукции». Обнаруженный и выделенный гельминтологический материал консервировали в 70%-ном растворе этанола.

Подготовку экстракта из мышечных личинок трихинелл проводили по методу Ruitenberget al. (1976) [11].

Получение соматического фракционированного антигена трихинелл получали методом фракционирования цельного экстракта личинок паразита по модифицированной методике Magat and Jeska (1976) гельхроматографией на колонке размером 2,2x70 см, объемом 220 см² [12].

Получение экскреторно-секреторного антигена трихинелл получали путем инкубации личинок на среде ДМЕМ с добавлением L-глутамин (40 мкг/мл) и антибиотиков (гентамицин 2 мкг/мл и ампициллин 5 мкг/мл) и отбора белковых продуктов один раз в сутки на протяжении 3-5 суток. Полученные экскреторно-секреторные продукты культивирования подвергали диализу (против физиологического раствора, затем концентрировали против ПЭГ-6000) [13]. Хранили при -70 °C.

Электрофорез ЭС-Аг и С-Аг трихинелл проводили в 10%-ном ПААГ-SDS по методу *U.K. Laemmli et.al.* (1970) на аппарате для вертикального электрофореза (*Bio-Rad*, США) [14].

Постановка иммуноблотинга.

Электрофоретический перенос антигенов трихинелл из геля на нитроцеллюлозную мембрану и проявление специфических белковых полос с помощью сывороток крови инвазированных кроликов и/или гипериммунизированных кроликов осуществляли по общепринятой методике, описанной *H.Towbin et al.* (1979) [15].

Тестирование антисывороток *непрямым методом ИФА* проводили

Результаты

Экспериментальное заражение кроликов личинками Trichinella spiralis. Методом аналогового подбора было сформировано три экспериментальных группы по 3 особи в каждой. Возбудителем трихинеллеза *T.spiralis* инвазировали 1 и 2 группы кроликов, в дозах 3000 личинок на голову.

Помимо клинических наблюдений, еженедельно проводили взвешивание кроликов и измеряли температуру прямой кишки. Экспериментальные исследования продолжались в течение 70 суток.

В результате наблюдения за инвазированными животными была отмечена незначительная потеря

определением титров антисывороток по стандартной методике непрямого варианта ИФА с использованием полистирольных 96-луночных плоскодонных планшетов для ИФА (*Corning*, США) [16].

Статистическую обработку данных выполняли с помощью SPSS для Windows, версия 17.0 (SPSS Inc., Чикаго, Иллинойс, США). Дисперсионный анализ с повторными измерениями использовали для определения статистической значимости разницы между уровнями антител в различные моменты времени после заражения и при различных заражающих дозах. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $P < 0,05$

аппетита с 7-го по 31-е сутки опыта у 2-х кроликов (с заданными дозами 3000 личинок *T. spiralis*). Гипертермию наблюдали у одного кролика на 14-е сутки опыта при заданной дозе 3000 личинок трихинелл *T. spiralis*. У этого животного температура на предельной границе держалась с 7-го по 31-е сутки. Привес живой массы у животных опытной группы заметно отставал от контроля. Средний вес кроликов при заданных дозах 3000 личинок трихинелл на 70-е сутки опыта составил 4,1 кг против 4,6 кг контрольного животного.

С целью паразитологического исследования на 70-ый день после инвазирования кролики, экспериментально зараженные

T. spiralis, были подвергнуты эвтаназию путем внутримышечной инъекции ксилазина и внутривенной инъекции анестозола [17]. Паразитологическое исследование

срезов мышечной ткани и диафрагмы проводили компрессионным методом и подвергались тщательному микроскопированию (рисунок 1).

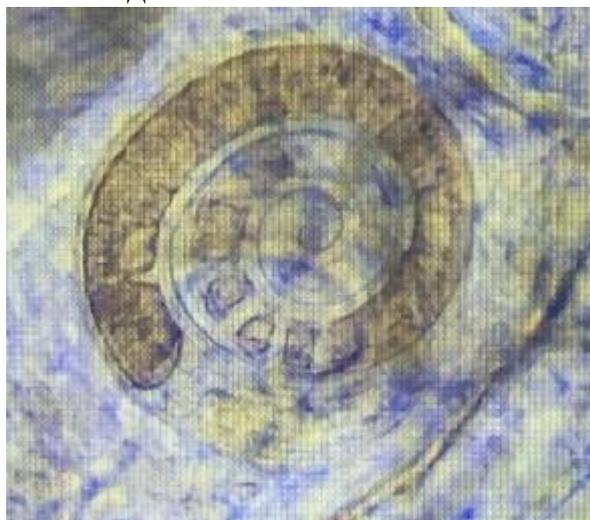


Рисунок 1 – Личинки *T. spiralis* в мышечной ткани кроликов под компрессором (x100) (оригинал)

При изучении характера и особенностей расселения (распределения) личинок трихинелл *T. spiralis* в поперечнополосатой мускулатуре кроликов выявили мышечный тропизм локализации этих гельминтов в отдельных группах скелетных мышц. Наиболее высокие показатели интенсивности инвазии (количество личинок в 1 г мышечной ткани) отмечены в мышцах головы ($61,6 \pm 51,3 - 129,1 \pm 102,4$), грудной конечности ($26,4 \pm 21,5 - 143,5 \pm 127,2$) и мышцах грудных стенок ($32,6 \pm 27,3 - 137,8 \pm 121,2$).

При экспериментальном заражении кроликов наименее инвазированными оказались мышцы плечевого пояса, позвоночного столба и брюшных стенок. Промежуточное положение

занимают мышцы грудной и тазовой конечностей.

Экспериментальную инвазию удалось вызвать у всех подопытных кроликов. Однако интенсивность инвазии была разной даже при условии введения одинакового количества личинок трихинелл, это может объясняться индивидуальной устойчивостью и разной сопротивляемостью организмов.

Выделение личинок трихинелл, получение экскреторно-секреторного и соматического антигенов. С целью получения ЭС-Аг и С-Аг, личинки трихинелл выделили из мышечной ткани экспериментально зараженных кроликов

Выделенные личинки трихинелл для получения экскреторно-секреторного антигена помещали в чашки Петри с

питательной средой ДМЕМ с добавлением L-глутамин (40 мкг/мл) и антибиотиков (гентамицин 2 мкг/мл). Плотность посева 5-10 тыс. личинок/мл, температура инкубации 37- 38,5°C. Выращивание личинок проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C с 5% содержанием углекислоты и 70%-ной влажностью, а также в обычном термостате при 38,5°C.

Белковые продукты отбирали один раз в сутки в течение 3–5-суток, после каждого отбора экскреторно-секреторных продуктов первоначальный объем восполняли добавлением новой порции питательной среды с L-глутамином. Жизнеспособность личинок трихинелл ежедневно оценивали под микроскопом, при обнаружении более 30% мертвых личинок культивирование прекращали.

Полученные экскреторно-секреторные продукты по разным срокам культивирования подвергали диализу в течение 48 ч против физиологического раствора (1:10) при температуре 4°C. После диализа антиген концентрировали против ПЭГ-6000. Содержание белка определяли по методу М.Бредфорда, после чего пропускали через бактериальную мембрану с диаметром пор 0,22-0,24 мкм. Хранили экскреторно-секреторный антиген при -70°C [18].

В результате культивирования инвазионных личинок *T.spiralis* в питательной среде ДМЕМ получили их экскреторно-секреторные продукты общим объемом 100 мл с содержанием белка в разных сериях от 125 до 1000 мкг/мл (таблица 1).

Таблица 1 – Концентрация белка в экскреторно-секреторных метаболитах личинок *T.spiralis*, культивированных в разных условиях

Условия культивирования	Концентрация белка в экскреторно-секреторных продуктах (мкг/мл) ЭС-Аг <i>T.spiralis</i>		
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки
CO ₂ -инкубатор с 5% CO ₂ 37°C	250±2,36	500±1,3	1000±2,03
Обычный термостат 38,5°C.	500±1,84	1000±1,8	1500±1,61

Как видно из данных таблицы 1 на 2-е и 3-и сутки культивирования личинок концентрация белка постепенно увеличивается. Вероятно, это связано с постепенной гибелью и разложением личинок в процессе инкубации, и с последующим выходом белка в культуральную жидкость. При культивировании

личинок в обычном термостате при 38,5°C после 24 ч. концентрация белка составила 1000-1500 мкг/мл, последующее культивирование было прекращено из-за гибели 30% личинок.

Подготовку полного соматического антигена получали путем фракционирования цельного

экстракта личинок трихинелл по модифицированной методике [12].

Очистку полученного соматического антигена проводили путем проведения гель-хроматографии на колонке *HisTrap* (*GEHealthcare*). Колонку предварительно уравнивали 0,1М трис-*HCl* буфером pH=8,0.

Образец предварительно ставили на диализ против элюирующего буфера в течение ночи при 4°C. Хроматографию проводили на аппарате *Akta Pure*, (США), результат представлен на рисунке 2.

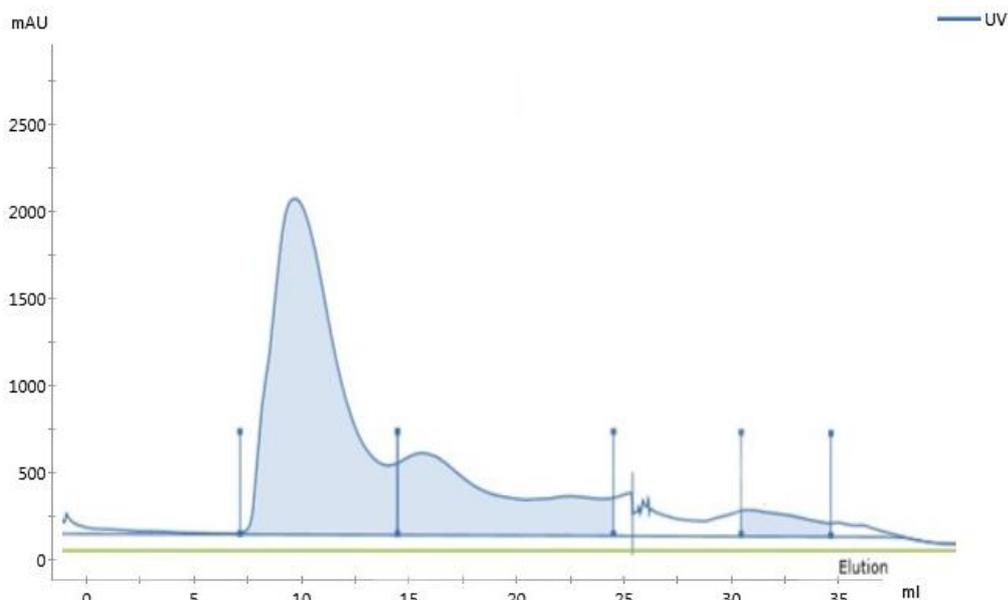


Рисунок 2 – Хроматографическое разделение соматического антигена

иммунохимических свойств полученных экскреторно-секреторных и соматических антигенов трихинелл, для этого на первом этапе проводили определение концентрации белка обеих антигенов путем измерения оптической плотности на приборе *NanoDrop*, в результате было определено, что концентрация экскреторно-секреторного антигена составляет 30-60 мкг/мл, концентрация соматического антигена 1000 мкг/мл.

Как видно по рисунку 2 в результате хроматографии было выделено 4 фракции белка. Фракции собирали по 3 мл в пробирки, а содержание белка определяли по методу Брэдфорда. В результате выявили, что в первой фракции с самым высоким пиком концентрация белка составила 1 мг/мл, в остальных фракциях концентрация была значительно ниже: 60, 125 и 30 мкг/мл, соответственно.

Изучение иммунохимических свойств соматических и экскреторно-секреторных антигенов трихинелл. На следующем этапе нами была проведена работа по изучению

Молекулярную массу белков полученных ЭС-Аг и С-Аг определяли методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях [19].

В результате электрофоретического анализа ЭС-Аг, полученного путем культивирования личинок, выявлены три мажорных белка молекулярной массой 50, 70 и 100 кДа.

В результате электрофореза в соматическом антигене *T.spiralis* выявили 4 фракции с молекулярной массой 120, 50, 30,17 кДа. После хроматографии выявлен белок молекулярной массой 300 кДа.

Для определения диагностической ценности каждой из белковых фракций, входящих в состав экскреторно-секреторного и соматического антигена, проводили иммуноблотинг с использованием позитивных сывороток крови. В качестве источника специфических антител использовали сыворотки крови экспериментально зараженных кроликов, в мышечной ткани которых были обнаружены личинки трихинелл (рисунок 3).



Рисунок 3 – Результат иммуноблотинга ЭС-Аг и С-Аг *T.spiralis*;
М-Маркер; 1 – ЭС-Аг *T. spiralis*; 2 – С-Аг *T. spiralis*

В результате исследования было выявлено, что в составе С-Аг *T.spiralis* в реакцию с иммуноглобулинами сывороток крови экспериментально зараженных животных вступают мажорные фракции с молекулярными массами 300 КДа, а в составе ЭС-Аг *T.spiralis* с сыворотками крови связалась

белковая фракция с молекулярной массой 15 кДа.

Таким образом, по итогам проведенной работы данного раздела изучены иммунохимические характеристики ЭС и С-Аг личинок *T.spiralis*, определены концентрации белка и белковый состав полученных антигенов.

Также изучена антигенность полученных препаратов ЭС-Аг и С-Аг в ИФА с сыворотками крови экспериментально зараженных животных в ходе развития инвазионного процесса. Сыворотки

крови отобраны на 7, 14, 31, 45 и 70 дни после заражения. Результаты исследований приведены на рисунке 4.

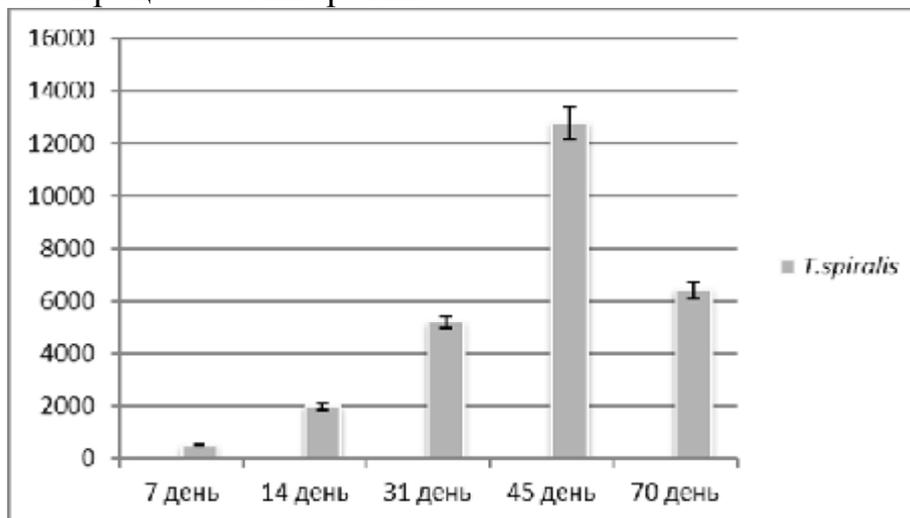


Рисунок 4 – Средний титр антител кроликов, зараженных личинками трихинелл, против ЭС-Аг *T. spiralis* в ИФА

Изучение антигенности ЭС антигенов, представленной на рисунке 4, показывает наличие специфических антител к полученным антигенам в группе кроликов, зараженных личинками *T. spiralis*. Начиная с 14 дня после заражения наблюдался выраженный рост специфических антител, однако на 70 день титр антител значительно снижался, но оставался в в достаточно высоких пределах от 1:800 до 12 800.

Определение диагностической ценности соматического и экскреторно-секреторного антигенов трихинелл в иммунологических реакциях. Иммуногенность проверяли путем введения кроликам полученных экскреторно-секреторных и соматических антигенов. Для иммунизации было использовано 9 кроликов, по методу аналогов

кроликов делили на три группы. Иммунизацию 1-й и 2-й групп кроликов проводили путем подкожного введения соматического и экскреторно-секреторного антигенов соответственно в пять точек вдоль хребта в дозах 100 мкг/мл, контрольной 3-й группе подкожно вводили физиологический раствор.

Иммунизация кроликов включала пятикратное введение препаратов подопытным животным, в первый день иммунизации вводили чистый препарат в концентрации 100 мкг/мл, контрольной группе вводили PBS, вторую иммунизацию проводили с неполным адьювантом Фрейда, концентрация препарата при этом была 50 мкг/мл, третья и четвертая иммунизации проводились с той же концентрацией антигена с PBS,

пятую иммунизацию проводили путем введения препарата в пять точек вдоль хребта и в бедренную мышцу с концентрации белка 20 мкг/мл. Данная схема была применена для выявления наличия иммуногенных свойств антигенов. Изучение активности полученных антигенов по отношению к иммунным сывороткам проводили в непрямом варианте иммуноферментного анализа.

В результате было установлено взаимодействие экскреторно-секреторного и соматических антигенов трихинелл с исследованными сыворотками. При этом максимальный титр специфических антител к экскреторно-секреторному антигену составил 1:3200, к соматическому 1:12800. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результат определения диагностической ценности полученных антигенов в иммуноферментном анализе с сыворотками крови иммунизированных животных.

Отбор крови	I группа			II группа			III группа
	Титр специфических антител						
11 день	1:800	1:1600	1:6400	1:800	1:400	1:800	PO
17 день	1:6400	1:6400	1:12800	1:3200	1:1600	1:6400	PO

*PO – реакция отсутствует

Исходя из полученных данных, приведенных в таблице 7, можно говорить о высокой диагностической ценности полученных антигенных

Обсуждение

В последние годы трихинеллез стал вновь возникающим паразитарным заболеванием, а тяжесть течения трихинеллеза у человека колеблется от субклинической до летальной [20]. Ранняя диагностика инфекции имеет решающее значение для своевременного и эффективного лечения трихинеллеза, поскольку антигельминтные препараты гораздо более эффективны в отношении взрослых гельминтов в кишечнике, чем в отношении инкапсулированных личинок в мышцах [21]. Поэтому важно

препаратов и возможности их использования в дальнейшей работе по разработке диагностических тестов для диагностики трихинеллеза.

идентифицировать антигены, распознаваемые иммунной системой хозяина на ранней стадии инфекции.

Нами проведена работа по экспериментальному заражению подопытных кроликов личинками трихинелл *T. spiralis*, выделенных от спонтанно зараженных животных. В результате исследования мышц зараженных кроликов выявили, что все животные, участвующие в эксперименте, были инвазированы личинками трихинелл, интенсивность инвазии в среднем составила 104300 экземпляров

T. spiralis на голову.

После изоляции личинок проводили наработку и очистку экскреторно-секреторных и соматических антигенов. Концентрация белка в образцах варьировала в пределах от 125 мкг/мл в ЭС-Аг и до 2000 мкг/мл в С-Аг.

Изучение иммунохимических свойств антигенов с применением иммуноблотинга и ИФА показало реакцию в составе ЭС-Аг с белковой фракцией с молекулярной массой 15 кДа, а в составе С-Аг – с белковой фракцией с молекулярной массой 300 кДа. Выявлены

диагностически ценные фракции белка 300 кДа, вступающие в реакцию с иммуноглобулинами сыворотки крови экспериментально зараженных животных. По результатам ИФА выявлены наличие специфические антитела к полученным антигенам в группе кроликов, зараженных личинками *T. spiralis*. Начиная с 14 дня после заражения наблюдался выраженный рост специфических антител, однако на 70 день титр антител значительно снижался, но оставался в достаточно высоких пределах до 12800.

Заключение

Отработан метод получения высокоактивных антител против экскреторно-секреторного и соматического антигенов *Trichinella spiralis*, которые могут быть использованы в разработке иммунологических тестов для определения трихинеллеза.

Информация о финансировании

Работа была выполнена в рамках реализации проектов грантового финансирования молодых ученых № АР09058176 по теме проекта: «Экспресс- тест для диагностики трихинеллеза» на 2021-2023 гг., финансируемой МОН РК.

Список литературы

- 1 [Noeckler K.](#), [Pozio E.](#), [Joke van der Giessen](#), [Dolores E Hill](#), [H. Ray Gamble](#). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on post-harvest control of *Trichinella* in food animals // Food and Waterborne Parasitology. – 2019. – V. 14. – P. 41-47.
- 2 Gamble H., Pozio E., Bruschi F., Nockler K., Kapel C., Gajadhar A. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man // Parasite. – 2004. – V.11. – P. 3-13.
- 3 Colangeli, R., Heijbel A., Williams A., Manca C., Chan J., Lyashchenko K., Gennaro M. Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Chromatogr. B – 1998. – V. 714. – P. 223-235.
- 4 Абдыбекова А., Лидер Л., Абдиева А. и др. Паразитозы, общие для человека и животных, регистрируемые в Республике Казахстан [Текст]:

учеб.-метод, пособие / А. Абдыбекова, Л. Лидер, А. Абдиева и др. – г. Нур-Султан: Изд-во Казахского агротехн. ун-та им.С.Сейфуллина, 2021 г. – 89 с.

5 Шабдарбаева Г., Абдыбекова А., Шапиева Ж. Антропозоозы и меры их профилактики в Республике Казахстан [Текст]: монография. – Алматы: Изд-во «S-Принт», 2012. – 104 с.

6 Dupouy-Camet J., Kociecka W., Bruschi F., Bolas-Fernandez F., Pozio E. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2002. – V. 3. – P. 1117-1130.

7 Nagano I., Wu Z., Takahashi Y. Molecular cloning and characterization of an Rcd1-like protein in excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis* // *Parasitology.* – 2006. – V. 133. – P. 785-792.

8 Escalante M., Romaris F., Rodriguez M., Rodriguez E., Leiro J., Garate M., Ubeira F. Evaluation of *Trichinella spiralis* larva group 1 antigens for serodiagnosis of human trichinellosis // *Journal of clinical microbiology.* – 2004. – V. 42, № 9. – P. 4060-4066.

9 Wang Zh., Fu G., Jing F., Jin J., Ren H., Jiang P., Cui J. Detection of *Trichinella spiralis* circulating antigens in serum of experimentally infected mice by an IgY-mAb sandwich ELISA // *Foodborne Pathog.* – 2012. – V.9, №8. – P. 33-727.

10 Wang L., Cui J., Hu D., Liu R., Wang Zh. Identification of early diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using immunoproteomics // *Parasites & Vectors.* – 2014. – V. 7. – P. 40-48.

11 Magat W., Jeska E. A sero diagnostic antigen for trichinellosis // *Acta Parasitologica Polonica.* – 1976. – V. 24. – P.191-198.

12 Leroux, L.-P., Nasr M., Valanparambil R., Tam M., Rosa B., Siciliani E., Jardim A. et al. Analysis of the *Trichuris suis* excretory/secretory proteins as a function of life cycle stage and their immunomodulatory properties // *Scientific Reports.* – 2018. – V. 8. – P. 1-17.

13 Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P.680-685.

14 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1979. – V. 76, № 9. – P. 4350-4354.

15 Gottstein B., Pozio E., Nockler K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis // *Clin Microbiol Rev.* – 2009. – V. 22. – P. 127-145.

16 Ortega-Pierres M., Yepez-Mulia L., Homan W., Gamble H., Lim P., Takahashi Y. et al. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite // *Parasite Immunol.* – 1996. – V. 18, №6. – P. 273-284.

17 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. – V. 72. – P.248-254.

18 Cui J., Wang L., Sun G., Liu L., Zhang S., Liu R. et al. Characterization of a *Trichinella spiralis* 31 kDa protein and its potential application for the serodiagnosis of trichinellosis // *Acta Trop.* – 2015. – V.142. – P.57-63.

19 Dupuy-Camet J., Bruschi F. Management and diagnosis of human trichinellosis. In: Dupuy-Camet J., Murrell K., editors. *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*. Paris, 1st ed. FAO/WHO/OIE, 2007. – P. 37-68.

20 Yang J., Pan W., Sun X. et al. Immunoproteomic profile of *Trichinella spiralis* adult worm proteins recognized by early infection sera // *Parasites Vectors.* – 2015. – V.8, №1. – P. 20-31.

21 Wang Z., Wang L., Cui J. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* proteins in intestinal epithelial cells after culture with their larvae by shotgun LC-MS/MS approach // *J Proteomics.* – 2012. – V.75, №8. – P. 2375-2383.

References

1 [Noeckler K.](#), [Pozio E.](#), [Joke van der Giessen](#), [Dolores E Hill](#), [H. Ray Gamble](#). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on post-harvest control of *Trichinella* in food animals // *Food and Waterborne Parasitology.* – 2019. – V. 14. – P. 41-47.

2 Gamble H., Pozio E., Bruschi F., Nockler K., Kapel C., Gajadhar A. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man // *Parasite.* – 2004. – V.11. – P. 3-13.

3 Colangeli, R., Heijbel A., Williams A., Manca C., Chan J., Lyashchenko K., Gennaro M. Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Chromatogr. B* – 1998. – V. 714. – P. 223-235.

4 Abdybekova A., Lider L., Abdieva A. i dr. *Parazitozy, obshchie dlya cheloveka i zhivotnyh, registriruemye v Respublike Kazahstan [Tekst]: ucheb.-metod, posobie* / A. Abdybekova, L. Lider, A. Abdieva i dr. – g. Nur-Sultan: Izd-vo Kazahskogo agrotekhn. un-ta im.S.Sejfullina, 2021 g. – 89 s. (In Russian).

5 SHabdarbaeva G., Abdybekova A., SHapieva ZH. *Antropozoonozy i mery ih profilaktiki v Respublike Kazahstan [Tekst]: monografiya.* – Almaty: Izd-vo «S-Print», 2012. – 104 s. (In Russian).

6 Dupouy-Camet J., Kociecka W., Bruschi F., Bolas-Fernandez F., Pozio E. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2002. – V. 3. – P. 1117-1130.

7 Nagano I., Wu Z., Takahashi Y. Molecular cloning and characterization of an Rcd1-like protein in excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis* // *Parasitology.* – 2006. – V. 133. – P. 785-792.

8 Escalante M., Romaris F., Rodriguez M., Rodriguez E., Leiro J., Garate M., Ubeira F. Evaluation of *Trichinella spiralis* larva group 1 antigens for serodiagnosis of human trichinellosis // *Journal of clinical microbiology.* – 2004. – V. 42, № 9. – P. 4060-4066.

9 Wang Zh., Fu G., Jing F., Jin J., Ren H., Jiang P., Cui J. Detection of *Trichinella spiralis* circulating antigens in serum of experimentally infected mice by an IgY-mAb sandwich ELISA // *Foodborne Pathog.* – 2012. – V.9, №8. – P. 33-727.

10 Wang L., Cui J., Hu D., Liu R., Wang Zh. Identification of early diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using immunoproteomics // *Parasites & Vectors.* – 2014. – V. 7. – P. 40-48.

11 Magat W., Jeska E. A sero diagnostic antigen for trichinellosis // *Acta Parasitologica Polonica.* – 1976. – V. 24. – P.191-198.

12 Leroux, L.-P., Nasr M., Valanparambil R., Tam M., Rosa B., Siciliani E., Jardim A. et al. Analysis of the *Trichuris suis* excretory/secretory proteins as a function of life cycle stage and their immunomodulatory properties // *Scientific Reports.* – 2018. – V. 8. – P. 1-17.

13 Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P.680-685.

14 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1979. – V. 76, № 9. – P. 4350-4354.

15 Gottstein B., Pozio E., Nockler K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis // *Clin Microbiol Rev.* – 2009. – V. 22. – P. 127-145.

16 Ortega-Pierres M., Yepez-Mulia L., Homan W., Gamble H., Lim P., Takahashi Y. et al. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite // *Parasite Immunol.* – 1996. – V. 18, №6. – P. 273-284.

17 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. – V. 72. – P.248-254.

18 Cui J., Wang L., Sun G., Liu L., Zhang S., Liu R. et al. Characterization of a *Trichinella spiralis* 31 kDa protein and its potential application for the serodiagnosis of trichinellosis // *Acta Trop.* – 2015. – V.142. – P.57-63.

19 Dupuy-Camet J., Bruschi F. Management and diagnosis of human trichinellosis. In: Dupouy-Camet J., Murrell K., editors. *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis.* Paris, 1st ed. FAO/WHO/OIE, 2007. – P. 37-68.

20 Yang J., Pan W., Sun X. et al. Immunoproteomic profile of *Trichinella spiralis* adult worm proteins recognized by early infection sera // *Parasites Vectors.* – 2015. – V.8, №1. – P. 20-31.

21 Wang Z., Wang L., Cui J. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* proteins in intestinal epithelial cells after culture with their larvae by shotgun LC-MS/MS approach // *J Proteomics.* – 2012. – V.75, №8. – P. 2375-2383.

**TRICHINELLA SPIRALIS ЭКСКРЕТОРЛЫ-СЕКРЕТОРЛЫ ЖӘНЕ
СОМАТИКАЛЫҚ АНТИГЕНДЕРІН АЛУ ЖӘНЕ АНТИГЕНДІК
ҚАСИЕТТЕРІН АНЫҚТАУ**

Әкібеков Өркен Сұлтанхамитұлы
*Ветеринария ғылымдарының кандидаты, қауымдастырылған
профессор,
С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: orken.a.s@mail.ru*

Жағинар Фариза Сәбитқызы
*Техника ғылымдарының магистрі,
С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: fariza140292@mail.ru*

Сыздыкова Альфия Сафиоллақызы
*Техника ғылымдарының магистрі,
С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: halik.kz@mail.ru*

Гаджимурадова Айсарат Махмудқызы
*Техника ғылымдарының магистрі,
С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: aisarat3878@mail.ru*

Аканова Жаннара Жолдасқызы
*Ветеринария ғылымдарының кандидаты,
С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: azhzh80@mail.ru*

Түйін

Трихинеллез қазіргі күнге дейін жануарлар мен адамдардың өміріне және денсаулығына қауіп төндіруде. Паразиттің толық зерттелуіне карамастан, оның дернәсілдері организмге енгенде, яғни бастапқы ішек сатысы кезінде ерте балау әдістері оны анықтауға мүмкіндік бермейді. Иммунды ферментті талдау әдісі көмегімен 2-4 аптадан кейін жұқтырылған паразитті анықтауға болады, бұл кезде ересек дернәсілдер бұлшықетте капсуляциялануы мүмкін. Қазіргі кезде экскреторлық-секреторлық және соматикалық антигендерді қолдану арқылы ИФТ әдісімен балау ең тиімді болып табылады. Осы зерттеулерімізде жабайы жануарлардың ұшаларынан бөлініп алынған *Trichinella spiralis*-тің кең таралған түрлеріне экскреторлық-

секреторлық және соматикалық антигендер алынды. Электрофорез нәтижесінде ЭС-Аг-нің молекулалық салмағы 45-тен 100 кДа және молекулалық салмағы 25-тен 300 кДа-ға дейінгі С-Аг ақуыздық құрамы анықталды. Иммуноблот әдісі көмегімен эксперименттік жолмен жұқтырылған жануарлардың қан сарысуының иммуноглобулиндерімен байланысатын 15 кДа экскреторлық-секреторлық және 300 кДа соматикалық антигеніне телімді балау құндылығы жоғары ақуыздық фракциялары анықталды. ИФТ нәтижесінде алынған антигендерге телімді антиденелердің болуы анықталып, *T. spiralis* қапсуланған дернәсілдерімен ауырған қояндардың тобында 14-ші күннен бастап телімді антиденелердің айқын жоғарылауы байқалды. Алайда, 70-ші күні антидене титрі айтарлықтай төмендеді, бірақ 1:800-ден 1:12 800-ге дейін жоғары диапазонда қалды. Осылайша, экскреторлы-секреторлы антигенді қолдану инвазиялық кезеңнің 14-ші күннен бастап инвазияның болуын анықтауға мүмкіндік береді.

Кілт сөздер: *Trichinella spiralis*; трихинеллез; дернәсіл; экскреторлы-секреторлы антиген; соматикалық антиген; балау; ИФТ.

OBTAINING EXCRETORY-SECRETARY AND SOMATIC ANTIGENS OF *TRICHINELLA SPIRALIS* AND DETERMINATION OF ANTIGENIC PROPERTIES

Akibekov Orken Sultanhamitovich

*Candidate of Veterinary Sciences, associate professor,
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: orken.a.s@mail.ru*

Zhagipar Fariza Sabitkyzy

*Master of Technical science,
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: fariza140292@mail.ru*

Syzdykova Alfiya Safiollaevna

*Master of Technical science,
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: halik.kz@mail.ru*

Gajimuradova Aissarat Mahmudovna

*Master of Technical science,
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: aisarat3878@mail.ru*

Akanova Zhannara Zhuldasovna
Candidate of Veterinary Sciences,
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: azhzh80@mail.ru

Abstract

Trichinellosis still poses a threat to the life and health of animals and people. Despite all its study, early diagnosis when parasite larvae enter the body does not show signs of invasion into the intestinal stage. Enzyme-linked immunosorbent assay reveals the presence of the parasite at 2-4 weeks after invasion, when in adults the larvae are already encapsulated in the muscles. To date, the most accurate method is ELISA using excretory-secretory and somatic antigens. The detection revealed excretory-secretory and somatic antigens to the most common detection of *Trichinella spiralis* isolated from carcasses of wild animals. As a result of electrophoresis, a certain composition of ES-Ag was revealed, the molecular weights of which vary from 45 to 100 kDa, and C-Ag with molecular weights from 25 to 300 kDa. Immunoblotting revealed valuable diagnostic isolations of the 15 kDa excretory-secretory protein, the 300 kDa somatic antigen, which are tested with the blood serum immunoglobulins of experimentally infected animals. According to the results of ELISA, the presence of specific antibodies to the obtained antigens was revealed in the group of rabbits infected with larvae of capsular *T. spiralis*, detected from 14 days after the detection of a pronounced growth of specific antibodies, however, on day 70, the antibody titer was high 1:800 to 1:12800. Thus, the use of excretory-secretory antigen makes it possible to determine the presence of invasion from the 14th day after infection.

Keywords: *Trichinella spiralis*; trichinellosis; larva; excretory-secretory antigen; somatic antigen; diagnostics; ELISA.