

АНТИГЕННОЕ РОДСТВО ЦИСТООБРАЗУЮЩИХ КОКЦИДИЙ РОДОВ ТОХОПЛАСМА И SARCOCYSTIS (ПРИКЛАДНОЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ)

Новак Михаил Дмитриевич, доктор биологических наук, профессор

Новак Александра Ивановна, доктор биологических наук, доцент

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева»

390044, г. Рязань, ул. Костычева, 1; тел.: +7 (4912) 35-35-01; e-mail: university@rgatu.ru

Ключевые слова: цистообразующие кокцидии, *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, антигены, антигенные взаимосвязи, методы иммунодиагностики, РНГА, НРИФ, ИФА.

Учитывая широкое распространение токсоплазмоза и саркоцистоза среди животных, значение саркоцистид в этиологии миокардитов и острых кишечных заболеваний человека, необходимо иметь представление о реальной эпизоотической и эпидемической ситуации по вышеуказанным болезням. Сероэпидемиологический и эпидемиологический мониторинг следует проводить с использованием высокоспецифичных иммунореагентов из пролиферативных форм *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. В работе применяли трофозоиты (тахизоиты) токсоплазм, полученные при пассажировании на лабораторных мышах и антигенные препараты *Sarcocystis*, выделенные от спонтанно зараженных сельскохозяйственных животных. При помощи иммунодиагностических тестов – НРИФ, РНГА и ИФА выявлены антигенные взаимосвязи цистообразующих кокцидий родов *Sarcocystis* и *Toxoplasma*, а также установлена степень антигенного родства различных видов *Sarcocystis*. Экспериментальным путем при помощи метода иммуносорбции установлено, что пролиферативные стадии *Toxoplasma gondii* содержат родственные для *Sarcocystis* антигенные фракции. Сыворотки крови зараженных саркоцистами ягнят реагируют с исходным токсоплазменным антигеном в титрах 1:40-1:320 (РНГА), 1:160-1:640 (ИФА), с саркоцистным антигеном – 1:160-1:5120 (РНГА), 1:160-1:10240 (ИФА) и общей для *Sarcocystis* фракцией токсоплазменного антигена – 1:40-1:640 (РНГА), 1:160-1:2560 (ИФА). Иммунологические и иммунобиохимические исследования свидетельствуют о филогенетической близости *Toxoplasma* и *Sarcocystis*, что согласуется с последовательным эволюционным преобразованием цистообразующих кокцидий от факультативно- к облигатно-гетероксенным. Для предупреждения ложноположительных результатов серологических исследований следует учитывать родственные антигенные связи тех паразитических простейших (*Sarcocystis*, *Toxoplasma gondii*), антигенами которых потенциально могут иммунизироваться животные и человек.

Введение

Известен широкий спектр иммунологических тестов, используемых для диагностики инфекционных в паразитарных болезнях (РНГА, РИФ, ИФА, Dot-ELISA и др.).

Большое значение в достоверной диагностике токсоплазмоза и других протозоозов, вызываемых цистообразующими кокцидиями, имеют специфичность антигенных препаратов, степень их очистки от антигенных компонентов таксономически родственных паразитических простейших [1]. Данные о распространенности токсоплазмоза, его реальной роли в различных видах патологии животных и человека, имеющиеся до настоящего времени в мире и России, получены на основе использования в иммунодиагностике антигенов токсоплазм, содержащих общие эпитопы с паразитическими простейшими подсемейства *Isosporinae* (*Sarcocystis*, *Cystoisospora*, *Neospora*, *Frenkelia*, *Besnoitia*) [2, 3]. Учитывая широкое распространение токсоплазмоза и саркоцистоза среди животных, значение саркоцистид в этиологии миокардитов и острых кишечных заболеваний человека [4, 5, 6], необходимо рас-

полагать подробной информацией о реальной эпизоотической и эпидемической ситуации по вышеуказанным болезням с использованием высоко специфичных иммунореагентов *Toxoplasma gondii* и *Sarcocystis* spp.

Объекты и методы исследований

В работе применяли пролиферативные формы токсоплазм, которые пассажировали на лабораторных мышах, а также антигенные препараты *Sarcocystis* spp. (метроциты, промежуточные клетки, мерозоиты), выделенные из мышечной ткани спонтанно зараженных сельскохозяйственных животных.

Материал для приготовления токсоплазменного антигена получали путем внутрибрюшинного введения белым мышам 0,2 мл перитонеального экссудата, разведенного стерильным физиологическим раствором и содержащего 80-100 токсоплазм штамма RH в поле зрения микроскопа ок.8х об.40.

В иммунобиохимических исследованиях для выделения специфических фракций антигенов использовали метод иммуносорбции на Sp Bg - активированной агарозе. Определение бел-

ка в полученных антигенных препаратах проводили в ультрафиолетовом спектре при помощи спектрофотометра Pye Unicam Sp 1800B. Кроме того, в серологических исследованиях (НРИФ, РНГА, ИФА) применяли гипериммунные сыворотки против *Sarcocystis diaphragmatica sp. n.* и *S. bovicanis*, *S. bertrami*, *Toxoplasma gondii* штамма RH, *Besnoitia besnoiti* и набор токсоплазменных сывороток фирмы Abbot. Иммунные сыворотки получали путем трех-, четырехкратной (один раз в неделю) подкожной и внутримышечной иммунизации кроликов различными антигенными препаратами в область поверхностных лимфатических узлов (с полным и неполным адъювантом Фрейнда). Реиммунизацию проводили через 14-18 дней двукратно внутримышечно. В ходе цикла иммунизации и по завершении проводили серологический контроль сывороток крови на активность специфических антител. Кровь у кроликов брали из краевой вены или артерии уха.

В качестве одного из компонентов для РНГА использовали эритроциты барана, формализованные по R. Weinbach. Для сенсибилизации эритроцитов применяли танин по методу Boyden S.V. в модификации Б. В. Каральника (1981). Апробированы эритроцитарные диагностикумы на основе антигенов *Sarcocystis bovicanis*, *S. bovihominis*, *S. diaphragmatica sp.n.*, *S. bertrami*, *S. ovifelis*, *T. gondii* - штамм RH. Постановку РНГА и ИФА осуществляли микрометодом. При оценке результатов НРИФ использовали микроскопы МЛ 2А и «ЛЮМАМ». РНГА проводили в иммунологических планшетах с U-образным дном микротитратора «Такачи». Оценку результатов ИФА проводили визуально и с помощью спектрофотометра «Titertek Uniskan» в ультрафиолетовом спектре при 492 нм.

Результаты исследований

Для выявления родственных антигенных детерминант саркоспоридий, токсоплазм и безноитий в НРИФ использовали корпускулярные антигены *Sarcocystis diaphragmatica sp. n.*, *S. bovihominis*, *S. bertrami*, *S. ovifelis*, тахизоиты *Toxoplasma gondii* штамма RH, цистозоиты *Besnoitia besnoiti*. Специфичность реакций контролировали, используя следующие кроличьи гипериммунные сыворотки: 1. саркоцистная против *S. diaphragmatica sp. n.* – рабочий титр 1:612; 2. *S. bovihominis* – 1:256; 3. *S. bertrami* – 1:512; 4. токсоплазменная – 1:1024; 5. безноитиозная – 1:256. Результаты исследований показали, что саркоцистные корпускулярные антигены *S. diaphragmatica sp. n.*, *S. bovihominis* и *S. bertrami* в НРИФ взаимодействуют с антителами к *Toxoplasma gondii* в невысоких титрах 1:16, 1:20 и 1:20 соответственно, а токсоплазменный антиген с иммунными саркоцистными сыворотками -

в более высоких разведениях от 1:20 до 1:40. При скрининге в НРИФ саркоцистных антигенов разных видов *Sarcocystis* и иммунной безноитиозной сыворотки выявлены слабopоложительные результаты – 1:4 - 1:8, а токсоплазменный антиген с этой же сывороткой – 1:8 - 1:16 - 1:20. Используя пять различных корпускулярных антигенов - *S. diaphragmatica sp. n.*, *S. bovihominis*, *S. bertrami*, *S. muris*, *Sarcocystis. sp. n.*, – кролика и иммунные кроличьи саркоцистные сыворотки к первым трем из них, при постановке НРИФ в гомологичной и гетерологичной системах установили, что изучаемые саркоцистные антигены однородны по антигенной структуре и незначительно отличаются по специфичности.

При изучении антигенных взаимосвязей *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, а также между некоторыми видами и стадиями развития *Sarcocystis* с помощью непрямого варианта ИФА рабочие титры саркоцистных и токсоплазменных антигенов определяли по общепринятой методике. Активность иммунных сывороток от кроликов из различных серий опытов варьировала и составляла: саркоцистные – от 1:1600 - 1:3200 до 1:6400; спорозоитные – 1:400 - 1:3200; токсоплазменные – 1:800 - 1:1600 - 1:3200. Рабочие разведения антигенов, устанавливаемые в каждом опыте, не имели существенных различий: саркоцистные антигены – 1:50 - 1:100; спорозоитные - 1:20; токсоплазменные – 1:40.

Полученные в различных сериях опытов похожие результаты по активности антигенов саркоцист и токсоплазм свидетельствуют о высоких показателях их стандартизации. При выполнении ИФА в гомологичной и гетерологичной системах выяснены следующие результаты: саркоцистный антиген (С Ag) + саркоцистная сыворотка (СС) – 1:3200 - 1:6400; С Ag + токсоплазменная сыворотка (ТС) – 1:200; С Ag + спорозоитная сыворотка (Сп С) – 1:200 - 1:400; С Ag + безноитиозная сыворотка (БС) – отрицательный результат; токсоплазменный антиген (Т Ag) + токсоплазменная сыворотка (ТС) – 1:800 - 1:3200; Т Ag + саркоцистная сыворотка (СС) – 1:400; Т Ag + спорозоитная сыворотка (Сп С) – 1:80 (табл. 1).

С помощью ИФА проведено изучение антигенных взаимосвязей различных видов *Sarcocystis*. Саркоцистные антигены оказались близки по структуре, а выявленные некоторые их отличия следует учитывать при серологической, в том числе дифференциальной диагностике саркоцистоза и токсоплазмоза. Иммунологический скрининг позволил установить разные уровни титров антител в зависимости от того, какой антиген (*Sarcocystis diaphragmatica sp. n.*, *S. bovihominis*, *S. bertrami*) используется в гетерологичной системе. В ИФА с антигенами *S. bovihominis* и *S. bertrami*

Таблица 1

Перекрестные иммунологические реакции в ИФА между антигенами *Sarcocystis*, *Toxoplasma* и *Besnoitia*

Название иммунных сывороток	Антигены и их рабочие разведения		
	Саркоцистный 1:100	Спорозойтный 1:50	Токсоплазменный 1:50
Спорозойтная (Сп С)	1:400	1:1600-1:1320	1:80
Сп С1	1:200-1:400	1:3200-1:6400	-
Сп С2	1:400	1:3200	1:80
Сп С3	1:400	1:1600	1:80
Отрицательный контроль	-	-	-
Саркоцистная (СС)	1:3200-1:6400	1:400	1:200-1:400
Токсоплазменная (ТС)	1:200	1:80	1:3200
Безноитиозная (БС)	-	-	-

различия результатов в гомологичной и гетерологичной системах составили одно-два разведения, с антигеном *S. diaphragmatica sp. n.* – три, что объясняется наличием у первых двух видов саркоцист большего количества свойственных для рода *Sarcocystis* антигенных детерминант, чем таковых у *S. diaphragmatica sp. n.* Основной опыт в ИФА с целью изучения антигенного родства представителей рода *Sarcocystis* показал следующие результаты: Аг *S. diaphragmatica sp. n.* + иммунная кроличья сыворотка (ИС) против *S. diaphragmatica sp. n.* – 1:5120, Аг *S. diaphragmatica sp. n.* + ИС *S. bovi hominis* (раб. титр 1:2560) – 1:640; Аг *S. diaphragmatica sp. n.* + ИС *S. bertrami* (раб. титр 1:6400) – 1:400; Аг *S. diaphragmatica sp. n.* + ИС *S. ovifelis* (раб. титр 1:1600) – 1:400 – 1:800; Аг *S. bovi hominis* + ИС *S. bovi hominis* – 1:2560; Аг *S. bovi hominis* + ИС *S. diaphragmatica sp. n.* – 1:640 – 1:1280; Аг *S. bovi hominis* + ИС *S. bertrami* – 1:1260; Аг *S. bovi hominis* + ИС *S. ovifelis* – 1:640; Аг *S. bertrami* + ИС *S. bertrami* – 1:6400; Аг *S. bertrami* + ИС *S. diaphragmatica sp. n.* – 1:5120; Аг *S. bertrami* + ИС *S. bovi hominis* – 1:2560; Аг *S. bertrami* + ИС *S. ovifelis* – 1:1280; Аг *S. ovifelis* + ИС *S. diaphragmatica sp. n.* – 1:640; Аг *S. ovifelis* + ИС *S. bovi hominis* – 1:640 – 1:1280; Аг *S. ovifelis* + ИС *S. bertrami* – 1:1280 (табл. 2).

Таким образом, при помощи непрямого варианта иммунодиагностических тестов (НРИФ, РНГА и ИФА) выявлены антигенные взаимосвязи между цистообразующими кокцидиями родов *Sarcocystis* и *Toxoplasma*, а также установлена степень антигенного родства различных видов *Sarcocystis*.

Между двумя родами цистообразующих кокцидий – *Sarcocystis* и *Toxoplasma* – имеются родственные антигенные связи (в НРИФ – 1:40, РНГА – 1:80 – 1:160, ИФА – 1:200 – 1:400).

Экспериментальным путем при помощи метода иммуносорбции установлено, что пролиферативные стадии *Toxoplasma gondii* содержат родственные для *Sarcocystis* антигенные фракции. Сыворотки крови зараженных саркоцистами ягнят положительно реагируют с исходным токсоплазменным антигеном в титрах 1:40 – 1:320 (РНГА), 1:160 – 1:640 (ИФА), с саркоцистным антигеном – 1:160 – 1:5120 (РНГА), 1:160 – 1:10240 (ИФА) и общей для *Sarcocystis* фракцией токсоплазменного антигена – 1:40 – 1:640 (РНГА), 1:160 – 1:2560 (ИФА).

Иммунологические и иммунобиохимические исследования свидетельствуют о филогенетической близости паразитических простейших *Toxoplasma* и *Sarcocystis*, что согласуется с последовательным эволюционным преобразованием цистообразующих кокцидий от факультативно-облигатно-гетероксенным.

Для предупреждения ложноположительных результатов серологических исследований необходимо учитывать родственные антигенные связи тех паразитических простейших (*Sarcocystis*, *Toxoplasma gondii*), антигенами которых в социально-бытовых и производственных условиях могут иммунизироваться животные и человек. Поэтому рекомендуется следовать определенной тактике выполнения иммунодиагностических тестов. Для дифференциальной диа-

Таблица 2

Перекрестные иммунологические реакции между антигенами различных видов *Sarcocystis* в ИФА

Иммунные сыворотки к антигенам	Антигены и их рабочее разведение			
	<i>S. diaphragmatica sp. n.</i> 1:200	<i>S. bovi hominis</i> 1:50	<i>S. bertrami</i> 1:100	<i>S. ovifelis</i> 1:50
<i>S. diaphragmatica sp. n.</i>	1:5120	1:640	1:400	1:400-1:800
<i>S. bovi hominis</i>	1:640-1:1280	1:2560	1:1280	1:640
<i>S. bertrami</i>	1:5120	1:2560-1:5120	1:640	1:1280
<i>S. ovifelis</i>	1:640	1:640-1:1280	1:1280	1:1280

гностики токсоплазмоза и саркоцистоза, а также определения состояний иммунизации антигенами *Sarcocystis*, *Toxoplasma gondii* проведение сероиммунологических исследований должно осуществляться в двух вариантах:

1) Аг 1 (*Toxoplasma gondii*) + гетерологичная иммунная сыворотка против Аг 2 (*Sarcocystis* spp.);

2) Аг 2 (*Sarcocystis* spp.) + гетерологичная иммунная сыворотка против Аг 1 (*Toxoplasma gondii*).

При исследовании сывороток крови мужчин и женщин 18-76 лет антитела к *Sarcocystis* выявлены в НРИФ, РНГА и ИФА в 3,2-57 % случаев, что связано с иммунизацией растворимыми, термостабильными антигенами *Sarcocystis*, содержащимися в молоке. Часто встречаемые среди людей состояния иммунизации растворимыми саркоцистными антигенами являются одной из причин ложноположительных результатов серологических исследований на токсоплазмоз. Поэтому весьма актуальна правильная интерпретация полученных данных.

Библиографический список

1. Новак, М.Д. Филогенетические связи представителей семейства Isosporinae (Apicomplexa, Sporozoa, Eimeriidae) / М.Д. Новак, А.И. Новак //

Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе. Материалы межвузовской научно-практической конференции. 6-7 мая 1998 года. – Кострома: КГСХА, 1998. – С. 86-87.

2. Andrade, C. Serologische Untersuchungen zur Feststellung gemeinsamer Antigene von Toxoplasmen, Sarcosporidien und Kokzidien / C. Andrade, G. Weiland // Berl. u. Munch. tierarztl. Wschr. – 1971. – V. 84. – № 4. – S. 61-64.

3. Weiland, G. Serological cross-reaction between Toxoplasma and Hammondia / G. Weiland, M. Rommel, F. Seyerl // Zbl. Bacteriol. Parasitenk. Infektionskrankh und Hyg. – 1979. – V. 244, № 2-3. – P. 391-393.

4. Phylogenetic relationships of apicomplexan protist *Sarcocystis* as determined by small subunit ribosomal RNA comparison / A.M. Johnson, S. Illana, P. Hakendorf, P.R. Baverstock // J. Parasitol. – 1988. – V. 74, № 5. – P. 847-860.

5. The phylogenetic relationships of the genus *Eimeria* / A.M. Johnson, R. Fielke, J. Ellis, P.J. O'Donoghue, P.R. Baverstock // Bull. Soc. fr. Parasitol. – 1990. – V. 8, Sup. 1. – P. 242.

6. Antigenic, immunogenic and toxogenic properties of *Sarcosporidia* with special reference to *Sarcocystis tenella* / A. Bordjoski, V. Conic, Z. Savin, S. Katic, H.M. Khanfar // 4 th Int. Congr. Parasitol. Short commun. Sec. E. Lodz, 1978. – P. 7.

ANTIGENIC AFFINITY OF CYST-FORMING COCCIDIA OF TOXOPLASMA AND SARCOCYSTIS GENERA (APPLIED AND THEORETICAL VALUE)

Novak M.D., Novak A.I.

FSBEI "Ryazan State Agrotechnological University named after P.A. Kostychev", Ryazan, Kostycheva st, 1.
Tel. : +7 (4912) 35-35-01, e-mail: university@rgatu.ru

Key words: cystic coccidia, *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, antigens, antigenic interrelations, immunodiagnostic methods, indirect hemagglutination test, indirect immunofluorescence test, ELISA.

Taking into account the widespread expansion of toxoplasmosis and sarcocystosis among animals, the value of sarcosporidia in the etiology of myocarditis and acute intestinal diseases of people, it is necessary to have an accurate picture of the real epizootic and epidemic situation of the above diseases. Seroepizootological and epidemiological monitoring should be carried out using highly specific immunoreagents from the proliferative forms of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. Trophozoites (tachyzoites) of toxoplasma were used, which were obtained by means of passage on laboratory mice and *Sarcocystis* antigen preparations isolated from spontaneously infected farm animals. With the help of immunodiagnostic tests - indirect immunofluorescence test, indirect hemagglutination test, ELISA, antigenic relationships of the cystic coccidia of the *Sarcocystis* and *Toxoplasma* genera have been revealed, and the degree of antigenic affinity of various *Sarcocystis* species has been established. Experimentally, using the method of immunosorption, it was established that the proliferative stages of *Toxoplasma gondii* contain antigenic fractions related to *Sarcocystis*. The blood sera of sarcocyst - infected lambs react with the original toxoplasma antigen in the titers 1: 40-1: 320 (indirect hemagglutination test), 1: 160-1: 640 (ELISA), with the sarcocyst antigen - 1: 160-1: 5120 (indirect hemagglutination test), 1: 160-1: 10240 (ELISA) and common for the *Sarcocystis* fraction of toxoplasma antigen - 1: 40-1: 640 (indirect hemagglutination test), 1: 160-1: 2560 (ELISA). Immunological and immunobiochemical studies indicate the phylogenetic proximity of *Toxoplasma* and *Sarcocystis*, which is coherent with the consistent evolutionary transformation of cystic coccidia from facultatively to obligately heteroxenous. To prevent false positive results of serological studies, it is necessary to take into account the related antigenic links of those endamebas (*Sarcocystis*, *Toxoplasma gondii*), animals and humans can be potentially immunized by their antigens.

Bibliography

1. Novak, M.D. Phylogenetic connections of representatives of the Isosporinae family (Apicomplexa, Sporozoa, Eimeriidae) / M.D. Novak, A.I. Novak // Current Problems of Science in the Agro-Industrial Complex: Materials of the Inter-University Scientific and Practical Conference, Kostroma State Agricultural Academy, May 6-7, 1998. - Kostroma: KSAА, 1998. - P. 86-87.

2. Andrade, C. Serologische Untersuchungen zur Feststellung gemeinsamer Antigene von Toxoplasmen, Sarcosporidien und Kokzidien / C. Andrade, G. Weiland // Berl. U. Munch. Tierarztl. Wschr. - 1971. - V. 84. - No. 4. - S. 61-64.

3. Weiland, G. Serological cross-reaction between *Toxoplasma* and *Hammondia* / G. Weiland, M. Rommel, F. Seyerl // Zbl. Bacteriol. Parasitenk. Infektionskrankh und Hyg. - 1979. - V. 244. - № 2-3. - P. 391-393.

4. Johnson, A.M. *Sarcocystis* as determined by small subunit ribosomal RNA comparison / A.M. Johnson, S. Illana, P. Hakendorf, P.R. Baverstock // J. Parasitol. - 1988. - V. 74. - No. 5. - P. 847-860.

5. Johnson, A.M. The phylogenetic relationships of the genus *Eimeria* / A.M. Johnson, R. Fielke, J. Ellis, P.J. O'Donoghue, P.R. Baverstock // Bull. Soc. Fr. Parasitol. - 1990. - V. 8. - Sup. 1. - P. 242.

6. Bordjoski, A. Antigenic, immunogenic and toxogenic properties of *Sarcosporidia* with special reference to *Sarcocystis tenella* / A. Bordjoski, V. Conic, Z. Savin, S. Katic, H.M. Khanfar // 4 th Int. Congr. Parasitol. Short commun. Sec. E. Lodz. - 1978. - P. 7.