

Impact Factor:

ISRA (India) = 4.971
ISI (Dubai, UAE) = 0.829
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
PIHII (Russia) = 0.126
ESJI (KZ) = 8.716
SJIF (Morocco) = 5.667

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

SOI: [1.1/TAS](#) DOI: [10.15863/TAS](#)

International Scientific Journal Theoretical & Applied Science

p-ISSN: 2308-4944 (print) e-ISSN: 2409-0085 (online)

Year: 2019 Issue: 11 Volume: 79

Published: 25.11.2019 <http://T-Science.org>

QR – Issue



QR – Article



Shavkat Abdurasulov

Tashkent State Agrarian University
PhD, Docent of Department General Zootechnics,
Tashkent, Uzbekistan

Abdusalom Abdusattorov

Tashkent State Agrarian University
Doctor of Biological Sciences, Professor of Department General Zootechnics,
Tashkent, Uzbekistan

Abdimumin Amirov

Tashkent State Agrarian University
Independent Researcher, Assistant of department General Zootechnics,
Tashkent, Uzbekistan

VIRULENCE OF THEILERIA ANNULATA AND ITS RELATIONSHIP WITH THE ACTIVITY OF METALLOPROTEONASE AT DIFFERENT STAGES OF CULTIVATION

Abstract: The proteolytic activity of the metalloproteinase enzyme (MPE) decreased significantly with an increase in the number of passages. It is assumed that the expression of MPE and cytokines by infected cells is a marker or virulence factor of *Th.annulata*.

Key words: teileria, bodies, cell culture, *Theileria annulata*.

Language: Russian

Citation: Abdurasulov, S., Abdusattorov, A., & Amirov, A. (2019). Virulence of *Theileria annulata* and its relationship with the activity of metalloproteonase at different stages of cultivation. *ISJ Theoretical & Applied Science*, 11 (79), 219-223.

Soi: <http://s-o-i.org/1.1/TAS-11-79-46> **Doi:**  <https://dx.doi.org/10.15863/TAS.2019.11.79.46>

Scopus ASCC: 1300.

ВИРУЛЕНТНОСТЬ THEILERIA ANNULATA И ЕЁ ВЗАИМОСВЯЗЬ С АКТИВНОСТЬЮ МЕТАЛЛОПРОТЕОНАЗЫ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Аннотация: Протеолитическая активность фермента металлопротеиназы (ММП) существенно снижалась с увеличением числа пассажей. При этом предполагается, что экспрессия ММП и цитокинов инфицированными клетками является маркерами или факторами вирулентности *Th.annulata*.

Ключевые слова: тейлерия, гранатные тела, культура клеток, *Theileria annulata*.

Введение

УДК: 595.421/616.928.7

По данным Рипано Е. (1981) специфическая профилактика тейлерии крупного рогатого скота, вызываемого *Theileria annulata*, осуществляется путем введения животным живых шизонтов паразита, которые были ослаблены *in vitro*.

Ослабление достигается путем непрерывного прохождения исходного вирулентного паразита в клеточной культуре в течение примерно 60-300 пассажей в течение периода от нескольких месяцев до 2 лет. Степень аттенуации во время этого процесса контролируется путем периодического инокуляции восприимчивых телят с культивируемыми паразитами на разных уровнях и

Impact Factor:

ISRA (India) = 4.971
ISI (Dubai, UAE) = 0.829
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 0.126
ESJI (KZ) = 8.716
SJIF (Morocco) = 5.667

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

проверки клинических и иммунных реакций телят. Это является наукоемким и довольно дорогостоящим, трудоемким процессом. Исследователи обнаружили сильную взаимосвязь между вирулентностью и активностью протеолитического фермента в *Th. annulata*, инфицированных шизонтом, во время длительного культивирования [5, 7].

Металлопротеиназы (ММР) позднее были идентифицированы как факторы вирулентности *Th. annulata*, так как был дефицит к отсутствию активности металлопротеиназы 9 (ММР9) в низких (не аттенуированных) и высоких пассажах (аттенуированных) шизонт-инфицированных клеток (4). А это в свою очередь предполагает определить возможность разработки теста *in vitro* для мониторинга аттенуации культивированных шизонтов вместо текущих тестов у восприимчивых телят. С другой стороны, не было обнаружено прямой корреляции между активностью матриксных металлопротеиназ шизонт-инфицированных клеточных линий. Имеющаяся у нас возможность сравнения пассируемых в культуре клетокизолятов *Th.annulata* дала возможность определить взаимосвязь аттенуации (потери) вирулентности с ферментативной активностью на разных стадиях культивирования изолята паразита по описанному методу [5].

Материалы и методы

Изолят *Th.annuata* был получен от телят, путем подсадки клещей *H.anatolicum* инвазированных тейлериями, собранных из эндемического района Узбекистана. Культивирование осуществляли серийными пассажами в среде RPMI 1640. В процессе культивирования тейлерий исследовали на активность металлопротеиназы методом электрофореза, тогда как другие были сохранены в виде замороженного стабильта. Для сравнения использовали в качестве контроля мононуклеарные клетки периферической крови крупного рогатого скота, полученные от здоровых телят, которые обрабатывали аналогично инвазированным шизонтами клеткам.

Степень аттенуации во время этого процесса контролировали путем периодического инокуляции восприимчивых телят с культивируемыми паразитами на разных уровнях и проверки клинических и иммунных реакций телят.

Результаты исследования

Специфическая профилактика тейлерииоза крупного рогатого скота, вызываемого *Theileria annulata*, осуществляется путем введения животным живых шизонтов паразита, которые были ослаблены *in vitro* [5]. Ослабление достигается путем непрерывного прохождения исходного вирулентного паразита в клеточной

культуре в течение примерно 60-300 пассажей в течение периода от нескольких месяцев до 2 лет [2].

Исследователи обнаружили сильную взаимосвязь между вирулентностью и активностью протеолитического фермента в *Th. annulata*, инфицированных шизонтом, во время длительного культивирования [1]. Металлопротеиназы (ММР) позднее были идентифицированы как факторы вирулентности *Th. annulata*, так как был дефицит к отсутствию активности металлопротеиназы 9 (ММР) в низких (не аттенуированных) и высоких пассажах (аттенуированных) шизонт-инфицированных клеток [4]. А это в свою очередь предполагает определить возможность разработки теста *in vitro* для мониторинга аттенуации культивированных шизонтов вместо текущих тестов у восприимчивых телят. С другой стороны, не было обнаружено прямой корреляции между активностью матриксных металлопротеиназ шизонт-инфицированных клеточных линий [3]. Имеющаяся у нас возможность сравнения пассируемых в культуре клеток изолятов *Th. annulata* дала возможность определить взаимосвязь аттенуации (потери) вирулентности с ферментативной активностью на разных стадиях культивирования изолята паразита по ранее описанному методу [1].

На рис.1 изображена электрофоретически различная протеиназная активность инфицированных шизонтами клеток из пассажей от 10 до 117 в желатин-деградирующем субстрате SDS-PAGE 10% акриламидных гелей. Три линии коалесценции наблюдались в лизате клеток 20 µg/lane из пассажа 10 с относительной молекулярной массой (Мг) от 200 до 62 кДа (рис.1, дорожка 1). Четкие полосы (рисунок 1, дорожка 2) можно было четко видеть, когда половину этого количества применяли к 8% акриламидному гелю, содержащему 0,2% желатина. Две полосы приблизительно 90 и 62 кДа были видны при приготовлении клеток из субкультуры 23 (рисунок 1, дорожка 3). Активность фермента постепенно снижалась по мере увеличения числа пассажей, наблюдалась только одна сплошная полоса с лизатами из пассажей 32 и 43 (рис.1, дорожки 4 и 5). Слабая связь была обнаружена в лизатах из пассажа 60 (рис.1, дорожка 6), и незначительные следы были найдены из пассажей 73 и 81 (рисунок 1, дорожки 6 и 7 соответственно) и с увеличением пассажей до 117 при культивировании шизонтов тейлерий активность фермента не наблюдалась. Протеолитическая активность не наблюдалась при приготовлении из РВМС здорового теленка (рис.1, дорожка 9).

На каждой полосе 10% SDS-PAGE и 0,2% желатина загружали 20 µg белок (за исключением полосы 2, загруженной 10 µg на 8% -ный гель, содержащий 0,2% желатина). Номер пассажа для каждой линии обозначен на рисунке. Дорожка 9

Impact Factor:

ISRA (India) = 4.971
ISI (Dubai, UAE) = 0.829
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 0.126
ESJI (KZ) = 8.716
SJIF (Morocco) = 5.667

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

представляет собой неинфицированные контрольные клетки. Левые числа указывают

приблизительную относительную молекулярную массу (за исключением полосы 2).

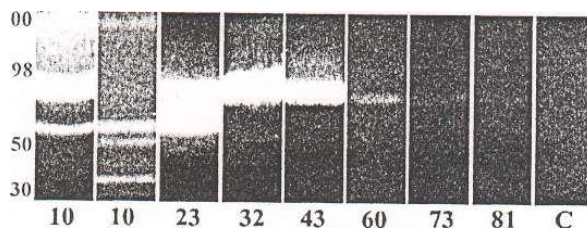


Рисунок 1. Ферментативная активность шизонт инфицированных клеток при различных уровнях пассажа

Для сравнения мы взяли данные (5), где сравнивали активность ферментов узбекского и израильского изолятов тейлерий (рис. 2).

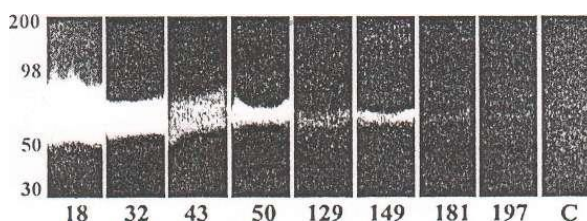


Рисунок 2. Ферментативная активность шизонт-инфицированных клеток израильского изолята при пассировании до 197 пассажа.

На каждую полосу 10% SDS-PAGE и 0,2% желатина загружали 20 мкг белка. Номер пассажа указан на рисунке. Lane "9" представляет собой неинфицированные контрольные клетки.

В случае израильского вакцинного штамма в пропитанном желатином геле наблюдалась интенсивная широкая полоса с лизатом из пассажа 18 (рис.2, дорожка 1). Интенсивность постепенно снижалась с приготовлениями от 32 пассажа до 149 (рис.2, дорожки 2-6), и только слабая, едва заметная полоса происходила с лизатами из субкультур 181 и 197 пассажа (рис.2, полосы 7 и 8 соответственно). Протеолитическая активность не наблюдалась у неинфицированных РВМС крупного рогатого скота (рис.2, дорожка 9).

Все тестируемые ингибиторы не влияли на активность фермента, за исключением ЭДТА, независимо от исследуемого штамма (не показано). ЭДТА полностью ингибирует активность фермента при максимальной концентрации 5 мМ до самой низкой концентрации 0,01 мМ.

После введения телятам шизонтов узбекского изолята, культивированными до 50 пассажа, демонстрируют повышенные температуры (выше 39,5°C). Шизонты были обнаружены в мазках биопсии у 6 из 10 телят, а эритроцитарные гаметоциты были обнаружены в мазках периферической крови у всех телят. С другой стороны, из шести телят, которым вводили шизонты 60 - 80 пассажа, лихорадка наблюдалась только у одного теленка, ни у одного из них не было шизонтов в мазках биопсии, но у четырех

животных были обнаружены гаметоциты. Не было никаких клинических реакций у шести телят, инокулированных клетками из пассажей 90 или более до 117 пассажа и гаметоциты в эритроцитах не обнаруживались.

По этим данным, у двух телят, зараженных шизонтами клеток в 43 пассаже израильского изолята, у одного развивалась лихорадка, появлялись шизонты в мазках биопсии из лимфатических узлов или печени и эритроцитарных мерозоитов в мазках крови. Другой теленок не проявил клинической реакции, но гаметоциты были обнаружены в мазках крови. Не было никаких клинических реакций у двух телят, инокулированных клетками из 200 пассажа. Для пассажей от 43 до 200 в этой работе не были посеяны телята. Поскольку в период с 1970 года по настоящее время этот вакцинный штамм неоднократно использовался для вакцинации крупного рогатого скота пассажами 80 и выше. Таким образом, аттенуированный пассаж для этого штамма (1) был между 43 и 80, сравнимый с аналогичным пассажем в узбекском штамме (5).

Все животные демонстрировали титры антител при разведениях сыворотки в пределах от 1:64 до 1:1024, независимо от количества штамма или пассажа.

Реакция телят, иммунизированных узбекским изолятом 117 пассажем на заражение гомологичными спорозитами (замороженный супернатант из зараженных клещей). Телята демонстрировали среднюю максимальную

Impact Factor:

ISRA (India) = 4.971
ISI (Dubai, UAE) = 0.829
GIF (Australia) = 0.564
JIF = 1.500

SIS (USA) = 0.912
РИИЦ (Russia) = 0.126
ESJI (KZ) = 8.716
SJIF (Morocco) = 5.667

ICV (Poland) = 6.630
PIF (India) = 1.940
IBI (India) = 4.260
OAJI (USA) = 0.350

температуру в 40,0-40,1°C по сравнению с 41,4°C у неиммунизированных животных. Незначительное повышение температуры тела продолжалось в течении 2-3 дней, по сравнению с 7 днями гипертермии у неиммунизированных контрольных телят. У всех животных шизонты были обнаружены в мазках биопсии: средняя группа менее 1% паразитов у иммунизированных телят, по сравнению с 11% у контрольных животных. У

иммунизированных животных обнаружены мерозоиты от <0,01% с наибольшей паразитемией в 2%, по сравнению с группой, состоящей из 17,3% паразитированных эритроцитов у контрольных телят.

Полученные данные мы сравнили данными Shkar et al. [6], где оценивалась активность ферментов узбекского и израильского изолятов тейлерий (рис.2).

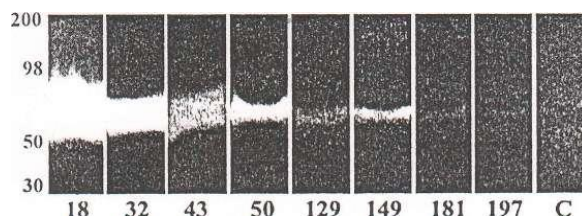


Рисунок 2. Ферментативная активность шизонт-инфицированных клеток израильского изолята при пассировании до 197 пассажа.

На каждую полосу 10% SDS-PAGE и 0,2% желатина загружали 20 мкг белка. Номер пассажа указан на рисунке. Линия 9 - «С» представляет собой неинфицированные контрольные клетки.

В случае израильского вакцинного штамма в пропитанном желатином геле наблюдалась интенсивная широкая полоса с лизатом из пассажа 18 (рис.2, дорожка 1). Интенсивность постепенно снижалась с приготовлениями от 32 пассажа до 149 (рис.2, дорожки 2-6), и только слабая, едва заметная полоса происходила с лизатами из субкультур 181 и 197 пассажа (рис.2, полосы 7 и 8 соответственно). Протеолитическая активность не наблюдалась у неинфицированных РВМС крупного рогатого скота (рис.2, дорожка 9).

Все тестируемые ингибиторы не влияли на активность фермента, за исключением ЭДТА, независимо от исследуемого штамма. ЭДТА полностью ингибирует активность фермента при максимальной концентрации 5 мМ до самой низкой концентрации 0,01 мМ.

Культивируемые шизонты *Th. annulata* показали четкое снижение активности металлопротеиназы (ММП), начиная с 60 пассажа и к до 117 пассажу полностью исчезала. До настоящего времени единственный надежный метод оценки ослабления вирулентности шизонтов для производства вакцины против тейлерииоза был основан на заражении животных инфицированными клетками на разных стадиях их

пассирования. Ферментативная активность ММП в инфицированных шизонтом клетках. При этом предполагается, что экспрессия ММП и цитокинов инфицированными клетками является маркерами или факторами вирулентности *Th. annulata*.

Эффект постепенной и прогрессирующей потери протеиназной активности отмечался с увеличением числа пассажа.

Таким образом, протеолитическая активность металлопротеиназы существенно снижалась с увеличением числа пассажей, что может быть применено в качестве маркера вирулентности.

Заключение

В нашей работе использовали маркером вирулентности при культивированных шизонтов *Th.annulata* с целью ослабления и получения вакцинного штамма. Это облегчила нашу работу, достигли своей цели без множественных заражений животных. Активность металлопротеиназы начал снижаться с 60 пассажи и 117 ом пассаже полностью исчезла.

Таким образом нам удалось получить вакцинный штамм шизонтов *Th.annulata* [Патент UZ №IAP 057668 15.02.2019]. При этом сокращали множественные пассажи, сэкономили животных и время на исследования.

Impact Factor:	ISRA (India) = 4.971	SIS (USA) = 0.912	ICV (Poland) = 6.630
	ISI (Dubai, UAE) = 0.829	PIHHI (Russia) = 0.126	PIF (India) = 1.940
	GIF (Australia) = 0.564	ESJI (KZ) = 8.716	IBI (India) = 4.260
	JIF = 1.500	SJIF (Morocco) = 5.667	OAJI (USA) = 0.350

References:

1. Baylis, S.A., Dixon, L.K., Vydelingum, S., & Smith, G.L. (1992). African swine fever virus encodes a gene with extensive homology to type II DNA topoisomerases. *Journal of Molecular Biology* 228, 1003–1010.
2. Boulter, N., & Hall, R., (1999). Immunity and Vaccine Development in the Bovine Theilerioses. *Advances in Parasitology*. V. 44, 41-97. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60230-4](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60230-4)
3. Graham, R.D., Welch, R.M., & Bouis, H.E. (2001). Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: principles, perspectives and knowledge gaps. *Advances in Agronomy*.V. 70. 77-142.
4. Njiiri, N.E., et al. (2015). The Epidemiology of tick-borne haemoparasites as determined by reverse line blot hybridization assay in an intensively studied cohort of calves in Western Kenya. *Vet. Parasitol.* 210: 69–76.
5. Pipano, E., Samish, M., Kriegel, Y., & Yeruhem, I. (1981). Immunization of Friesian cattle against *Theileria annulata* by the infection-treatment method. *Brit. vet. J., Vol. 137, №4*, p 416-420.
6. Shkap, V., et al. (2003). Protolytic enzyme activity and attenuation of virulence in *Theileria annulata* tashizont-infected cells. *Veterinary parasitology*, V. 115, 247-255.
7. Soatov, U.R. (2013). Gematologicheskie pokazateli korov v raznykh tipov teloslozheniya [Hematological indicators of cows in different body types] *Zh. Agrarnaya nauka*, 4(28), 48-49.