

БИОТЕХНОЛОГИЯ BIOTECHNOLOGY

УДК 578:616-079

Каукарбаева Мадина Жумагалиевна,аспирант, младший научный сотрудник лаборатории
диагностики инфекционных заболеваний**Адалбекова Алия Курмангазыевна,**

бакалавр, старший лаборант лаборатории диагностики инфекционных заболеваний

Жунушов Асанкадыр Темирбекович,

доктор ветеринарных наук, профессор, академик НАН КР

**ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ
ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИФА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО
ЛИМФАНГОИТА ЛОШАДЕЙ****Каукарбаева Мадина Жумагалиевна,**Аспирант, жугуштуу ооруларды диагностикалоо лабораториясынын
кенже илимий кызматкери**Адалбекова Алия Курмангазыевна,**

Бакалавр, жугуштуу ооруларды диагностикалоо лабораториясынын улук лаборанты

Жунушов Асанкадыр Темирбекович,

Ветеринария илимдеринин доктору, профессор, КР УИАнын академиги

**ЖЫЛКЫЛАРДЫН ЭПИЗООТИЯЛЫК ЛИМФАНГИТИНИН
ДИАГНОСТИКАСЫ УЧУН ИФА ТЕСТ СИСТЕМАСЫНЫН СПЕЦИФИКАЛЫК
ЖАНА КӨМӨКЧҮ КОМПОНЕНТТЕРИН АЛУУ****Kaukarbayeva Madina Zhumagaliyeva,**

Postgraduate student, Junior Researcher, Laboratory of Infectious Disease Diagnostics

Adalbekova Aliya Kurmangazyevna,Bachelor's degree, Senior Laboratory Technician of the Infectious
Diseases Diagnostic Laboratory**Zhunushov Asankadyr Temirbekovich,**

Doctor of veterinary sciences, professor, academician NAS KR

**OBTAINING SPECIFIC AND AUXILIARY COMPONENTS
OF THE ELISA TEST SYSTEM FOR THE DIAGNOSIS
OF EPIZOOTIC EQUINE LYMPHANGOIDITIS**

Аннотация. Эпизоотический лимфангит лошадей (ЭЛЛ) – африканский сап, хроническая инфекционная болезнь непарнокопытных, характеризующаяся гнойным воспалением кожи, подкожной клетчатки с поражением лимфатических сосудов и лимфатических узлов. ЭЛЛ распространён в Индии, Афганистане, Китае, Монголии и др. странах. Летальность 10-50 %. Возбудитель ЭЛЛ — дрожжевидный гриб *Histoplasma farciminosum* (*Cryptococcus farciminosus*), который в гное язв и фокусов при микроскопии имеет вид яйцевидных клеток (криптококков) с чётко выраженной двухконтурной оболочкой и часто заострённым концом. В их протоплазме содержится одно или несколько непрерывно колеблющихся зёрнышек. В гное криптококки лежат одиночно или кучками, часть из них включена в протоплазму макрофагов. Для выделения иммуноглобулинов из специфической сыворотки к возбудителю ЭЛЛ нами были использованы наиболее активные антисыворотки. На основе выделенного иммуноглобулина были получены две серии специфических конъюгатов по методу Уилсона и Накане, пригодных для постановки иммуноферментного анализа (ИФА). Используя вышеуказанные диагностические препараты, были отработаны оптимальные условия постановки прямого метода ИФА для обнаружения антигена данного возбудителя в различных испытуемых материалах.

Ключевые слова: лошадь, лимфангит, *Histoplasma farciminosum*, иммуноферментный анализ, сыворотка, иммуноглобулин, конъюгат.

ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотический лимфангит лошадей (лат. – *Lymphangoitis epizootika*; англ. – *Epizootic equine lymphangitis*; африканский сап, бластомикоз, эпизоотическое воспаление лимфатических сосудов) – хронический микоз однокопытных животных, характеризующийся воспалением лимфатических сосудов кожи и подкожной клетчатки с образованием гнойных фокусов и язв. Существуют три формы эпизоотического заболевания лимфангита у лошадей: кожный, глазной и респираторный. Кожная форма является наиболее распространенной, вызывая хронический, гнойный, изъязвляющий пиогранулематозный дерматит и лимфангит [1, 2].

Это заболевание, которое распространяется во всем мире, с эндемическими очагами в Северной Африке и Азии. Болезнь эндемична в странах, граничащих со Средиземноморьем, особенно в Италии и Северной Африке, а также в Центральной и Южной Африке, в регионах Азии, Индии, Афганистане, Монголии и России [3].

В Казахстане это заболевание было официально зарегистрировано в 1921 году. На протяжении многих лет, включая и настоящее время, ЭЛЛ наблюдается в Алматинской, Акмолинской, Павлодарской, Кызыл-Ординской, Жамбылской, Южно-Казахстанской, Павлодарской и Карагандинской областях, что приводит к гибели животных и значительным экономическим потерям в животноводстве [4].

Заболевание в основном касается лошадей, но также может затрагивать мулов и ослов. Согласно отчетам, 90 % случаев заболевания наблюдаются у лошадей, возникших в результате предыдущих мулов, в то время как ослы переносят эту болезнь реже. Темп распространения инфекции меняется в зависимости от географического региона. В результате этого заболевания у них появляются вторичные инфекции, и они часто оказываются брошенными, что можно наблюдать на обочинах дорог, где они остаются без еды и воды [5, 6].

Впервые болезнь наблюдали в XIV веке во французских и итальянских колониях Африки. Из-за схожести клинической картины, особенно на начальной стадии, её путали с сапом. Лишь в 1873 году итальянский ученый С. Ривольта обнаружил в гное из язв у лошадей возбудителя, а в 1883 году совместно с Мицелон выделил чистую культуру возбудителя. Однако в некоторых источниках

есть информация о том, что он не был успешно культивирован до 1896 года, когда первые чистые культуры были получены Токишигой в Японии [7, 8]. Bardelli и Ademollo в 1927 году сообщили о вирулентности организма после высушивания в лабораторных условиях в течение 25 месяцев. В то время как Geering et al. (1995) утверждают, что организм сохраняется до 15 дней в окружающей среде, Габал и Хеннагер в 1983 году сообщают о гораздо более длительном выживании, и температура, и влажность почвы влияют на жизнеспособность [9].

В России в 1897 году подробно описал болезнь и методы ее дифференциации от сапа М. Г. Тартаковский [10].

Эпизоотический лимфангит возникает инфекцией, вызванной диморфным грибом *Histoplasma capsulatum*. Этот грибок существует в форме дрожжей в тканях животных и в виде сапрофитного мицелия (плесени) в окружающей среде. Он относится к семейству *Ajellomycetaceae* и порядку *Onygenales*. Телеоморфная стадия этого организма называется *Ajellomyces capsulatus*. Обычно *H. capsulatum* делят на три подвида: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, вызывающий большинство случаев гистоплазмоза, особенно в Северной и Южной Америке; *H. capsulatum* var. *duboisii*, который встречается в диалекте и обычно регистрируется у людей; и *H. capsulatum* var. *Farciminosum*, вызывающий эпизоотический, или псевдогlanders. Другой синоним – гистоплазмоз лошадей, который может быть более точным названием, поскольку не во всех клинических случаях наблюдается явный лимфангит. Форма, которую принимает болезнь, по-видимому, зависит в первую очередь от пути проникновения [12].

Кожную форму заболевания можно спутать с фарси (кожной формой glandов), вызываемой *Burkholderia mallei*, язвенным лимфангитом, вызываемым *Corynebacterium pseudotuberculosis*, индолентными язвами, вызванными *Rhodococcus equi*, споротрихозом, вызванным *Sporothrix schenckii*, и гистоплазмозом, вызванным *H. capsulatum* var. *capsulatum*, криптококкозом, странгулезом, саркоидой и кожные лимфосаркомы, поэтому важно проводить подтверждение возбудителя болезни [13].

Современная медицина акцентирует внимание на диагностике, которая является необходимым условием для постановки диагноза и определения причин заболевания. В настоящее время применяются новые ме-

тоды диагностики. Установление диагноза основывается на совокупности эпизоотологических и клинических данных, патолого-анатомических изменений, серологических исследований образцов сыворотки крови, микроскопического анализа экссудата из гнойных язв и содержимого утолщенных лимфатических сосудов, а также молекулярно-генетических исследований. Лабораторная диагностика эпизоотического лимфангита обычно осуществляется на основе окрашенных мазков кожного экссудата, где выявляются характерные дрожжеподобные клетки с двойным контуром в гное, собранном в асептических условиях из очага поражения, и подтверждается культивированием возбудителя [14].

Были разработаны два серологических метода и кожный тест на гиперчувствительность, которые оценивались на предмет их потенциального применения для диагностики гистоплазмоза у лошадей. Хотя инфекция в основном затрагивает кожные лимфатические пути, было установлено, что в процессе инфекции формируется значительный уровень гуморальных и клеточно-опосредованных антител. Титры 512-1,024 и 1,024-4,096 были получены с помощью пробирочного теста и теста пассивной гемагглютинации соответственно. Положительная кожная реакция наблюдалась через 48-71 час после инокуляции, разведенного 1 к 100 гистоплазмина, полученного из мицелиальной фазы выделенных штаммов. Тест на кожную гиперчувствительность оказался положительным как в случаях естественного заражения, так и у экспериментально sensibilizированных здоровых лошадей. Полученные результаты считаются многообещающими, и эти тесты могут быть использованы в качестве дополнительных методов диагностики [15].

Кроме того, разработаны тесты на флуоресцентные антитела, AGID и ELISA. В последнее время полимеразная цепная реакция (ПЦР) получила широкое применение в диагностике и генотипировании патогенных микроорганизмов. Кроме того, иммуноферментный анализ активно используется для диагностики различных инфекционных заболеваний. Многие исследователи предложили возможность идентификации возбудителей эпизоотического лимфангита с помощью РДСК [16]. Метод иммуноферментного анализа (ИФА) постоянно совершенствуется.

С одной стороны, увеличивается количество объектов исследования, с другой – углубляются и улучшаются методы самого анализа. Это приводит к упрощению схемы анализа, сокращению времени его проведения и уменьшению расхода реагентов [16].

Цель и задачи исследования. Получение специфических и вспомогательных компонентов тест-системы ИФА для диагностики ЭЛЛ.

Материалы и методы.

Иммунизацию кроликов проводили пятикратным введением антигена ЭЛЛ в определенной дозе внутрикожно, вдоль позвоночного столба, в пять точек с каждой стороны с интервалом между инъекциями 7-10 дней.

В качестве специфического использован иммуноглобулин, выделенный спиртовым методом Кона с активностью 1:32. Выделение гамма-глобулинов по методу Кона включает 3 этапа:

- первый – осаждение гамма и бета-глобулинов;
- второй – отделение бета-глобулина;
- третий – осаждение гамма-глобулина [17, 18].

Для выделения иммуноглобулинов из специфической сыворотки к возбудителю ЭЛЛ нами были использованы наиболее активные антисыворотки. На основе выделенного иммуноглобулина были получены две серии специфических конъюгатов по методу Уилсона и Накане [19].

Результаты и обсуждения

ИФА имеет ряд преимуществ перед другими методами: стабильность реагентов, меченных ферментами, отсутствие контакта с радиоактивными веществами, простота учета результатов реакции. Для постановки ИФА требуется наличие полноценных компонентов, обладающих чистотой и специфичностью.

Цель данной работы – получение специфических и вспомогательных компонентов тест-системы ИФА для диагностики ЭЛЛ. Работа проводилась в рамках программы BR218004/0223 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям».

Для разработки лабораторных тест-систем важную роль играет качество (специфичность и активность) диагностических препаратов, используемых в эксперименте. Для изготовления активных и специфич-

ных иммунопероксидазных конъюгатов необходимы активные и специфичные сыворотки против антигенов гриба *Histoplasma farciminosum*.

Для получения специфической сыворотки важным этапом является отбор животных. До начала иммунизации у будущих доноров отбирали образцы крови для постановки ИФА, РДП, РСК на обнаружение антител к возбудителям ЭЛЛ, чумы мелких жвачных животных, оспы овец, сибирской язвы с целью недопущения перекрестных реакций. При этом в сыворотках крови животных отсутствовали антитела к возбудителям вышеуказанных болезней. После получения результатов был проведен отбор животных (овец, коз и кроликов) для получения специфической сыворотки. Для гипериммунизации использовали очищенные культу-

ральные антигены штаммов «Т», «13/1» и «Караганда» гриба с активностью в РДП 1:32-1:64, в РСК не менее 1:40.

До начала цикла гипериммунизации овцам и козам подкожно в область предлопаточных лимфатических узлов ввели антигены гриба *Histoplasma farciminosum* в объеме по 1 мл, кроликам внутримышечно ввели антигены гриба *Histoplasma farciminosum* в объеме по 0,5 мл. Схема иммунизации отличалась объемами вводимого материала, концентрацией, интервалами между введениями и активностями вводимого материала.

Выделение иммуноглобулинов из специфической сыворотки против возбудителя ЭЛЛ проводили спиртовым методом Кона. Полученные иммуноглобулины проверяли на активность и специфичность в РДП, результаты исследований представлены в рисунке 1, 2.

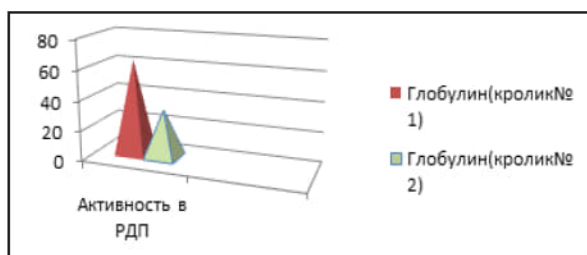


Рисунок 1 – Активность иммуноглобулинов в РДП

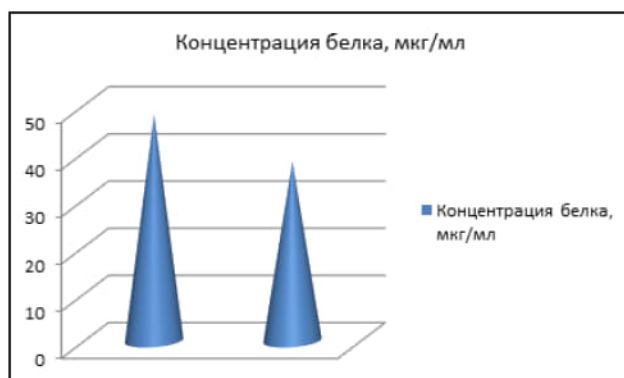


Рисунок 2 – Концентрация белков-глобулинов кроликов.

Данные рисунков 1 и 2 свидетельствуют о том, что активность иммуноглобулинов в РДП составила в пределах 1:32-1:64, а концентрация белка-глобулина (кролик №1) – 48 мкг/мл, глобулин (кролик №2) – 38 мкг/мл. На основе выделенного иммуноглобулина были получены две серии специфических конъюгатов по методу Уилсона и Накане.

Для приготовления специфических конъюгатов использованы γ-иммуноглобулины с активностью в РДП 1:32-1:64, выделенные по методу Кона.

Показатели оптической плотности специфических конъюгатов при длине волны 280, 403 показаны в таблице 1, а профиль элюции на рисунках 3 и 4.

Таблица 1. – Показатели оптической плотности и профиль элюции иммунопероксидазных конъюгатов

№ серий	Иммунопероксидазные конъюгаты	Длина волны	Показатели оптической плотности						
			Номера фракций конъюгатов						
			1	2	3	4	5	6	7
1	Конъюгат №1 (иммуноглобулин кроличья №1)	280	0,012	0,721	1,587	1,272	0,907	0,416	0,150
		403	0,018	0,271	0,515	0,398	0,260	0,179	0,183
2	Конъюгат №2 (иммуноглобулин кроличья №2)	280	0,144	0,473	0,966	1,372	0,921	0,435	0,361
		403	0,052	0,178	0,426	0,490	0,390	0,501	0,400

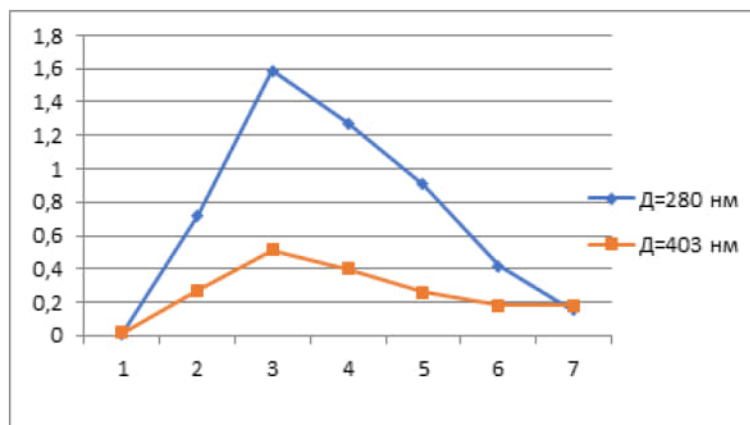


Рисунок 3 – Профиль элюции иммунопероксидазного конъюгата №1

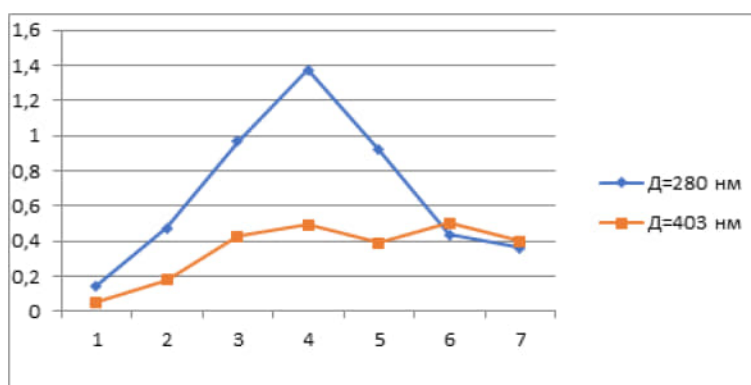


Рисунок 4 – Профиль элюции иммунопероксидазного конъюгата №2

Активность и специфичность, приготовленных иммуноферментных конъюгатов по методу Уилсон и Накане проверяли в ИФА, предельная активность которых составила 1:800-1:1600.

Для каждой фракции конъюгата вычисляют показатель «RZ» по формуле $RZ = D_{403}/D_{280}$

Фракции с $RZ = 0,3-0,6$ собирают в единый конъюгат, остальное отбрасывают.

Заключение

В результате проведенных исследований из кроличьей антисыворотки, полученной к антигену ЭЛЛ, выделены высокоактивные специфические иммуноглобулины, на их основе приготовлены специфические иммунопероксидазные конъюгаты.

Выделены по 2 серии иммуноглобулины к возбудителю ЭЛЛ, активность иммуноглобулинов к возбудителю ЭЛЛ в РДП составила 1:32-1:64.

На основе выделенных иммуноглобулинов приготовлены по 2 серии конъюгата к возбудителям ЭЛЛ по методу Уилсона и

Накане, активность конъюгатов в ИФА составила 1:800-1:1600. Полученные вышеуказанные диагностические препараты были использованы для отработки оптимальных условий постановки ИФА для обнаружения антигена данного возбудителя в различных испытуемых материалах.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № BR218004/0223).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература:

1. Epizootic Lymphangitis Pseudoglanders, Pseudofarcy, Equine Histoplasmosis, Histoplasmosis Farciminosi, African Farcy, Equine Blastomycosis, Equine Cryptococcosis Last Updated: December 2019 <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/18632378> Лекции. Ветеринария «Инфекционные болезни лошадей» Эпизоотический лимфангит <https://studizba.com/lectures/veterinariya/infekcionnye-bolezni->
2. Hadush, B., Biratu, D., Taddele, H., Tesfaye, D., Ameni, G. (2014). Bacterial contaminants isolated from lesions of equine histoplasmosis in cart horses of Mekelle town, northern Ethiopia // *Revue Méd. Vet.*, 2014., Vol. 165., P. 25–30. <https://www.researchgate.net/publication/261985757>
3. Сансызбай А.Р., Зайцев В.Л., Сандыбаев Н.Т. и др. В кн.: «Эпизоотический лимфангит лошадей: Биологические, физико-химические свойства и диагностика». – Алматы, 2012. – С. 243.
4. Spesivtsevia, N.A., Noskov, A.I. (1959). Epizootic lymphangitis in camels // *Trudy Vses Institute Vet. Sanit. Ectopar.*, 1959., Vol. 14., 86 p. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-030-69507-1>
5. Guslavskii, I.I. (1990). Epizootic lymphangitis and control measures. Kainar, 1990-15 с.
6. Журнал ARC по животным и ветеринарным наукам. Том 5, выпуск 1, 2019, страницы № 15–23 <https://www.arcjournals.org/journal-of-animal-and-veterinary-sciences/volume-5-issue-1/3>
7. Rivolta S. & Micellone I. (1883.-Del farcinocriptococchio. *Giorn. Anat. Patol. Anim.dom.*, 15, 143-162.
8. Tokishiga M. (1896). - Überpathogene Blaslomkosen. *Zentralbl.Bakteriol.*, 19, 10
9. Bardelli P. & Ademollo A. (1927). - Sulla resistenzadelle Conture di *Cryptococcus farciminosus*. Rivoltaagliagentifici e chimici. *Annual Igiene*, 37, 81-85
10. Сидорчук А.А., Масимов А.А., Крупальник В.Л. Инфекционные болезни животных- 2е издание, ИНФРА.М. 2017. – 954с.
11. Epizootic lymphangitis. WOAH Terrestrial Manual 2018 [https://www.woah.org/fileadmin/](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.06.04_epiz_lymphangitis.pdf)
12. Пол Ф. Юнгерман и Роберт М. Шварцман| 1 января 1972 г. «Ветеринарная медицинская микология» <https://www.amazon.com/Veterinary-medical-mycology-Paul-Jungerman/dp/081210322X>
13. Кашкин П.В., Лисин В.В. (1983). Практическое руководство по медицинской микологии. Ленинград «Медицина», 1983., С.166-168.
14. Study on the Immune Response and Serological Diagnosis of Equine Histoplasmosis (Epizootic Lymphangitis) Dr. M. A. Gabal, K. Khalifa <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1983.tb01850.x>
15. Сапа, В.А., Ергазина, А.М. (2022). Редкие и трансграничные инфекционные болезни: учебное пособие., Костанай, 2022., С. 100-103.
16. Абеуов Х.Б., Кошеметов Ж.К., Оразымбетова Н.К., Сейсенбаева М.С. Маткеримова К., Выделение иммуноглобулинов из антихламидийных сывороток https://elibrary.ru/download/elibrary_41546325_87819955.pdf

17. Иммобилизация антител на нейлоне для использования в иммуноферментном анализе. Р. Майкл Хендри 2 ;Джон Э. Херрманн . [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90255-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90255-0)
18. Wilson M.B., Nakane P.K. Recent development in the periodate method of conjugating horse-radish peroxidase (HRPO) to antibodies. - In.: Immunofluorescence and related staining techniques, eds. Knapp
19. W., Holubán K., Wick G., Elsevier/North-Holland //Biomedical Press. - 1978. - P. 215-244.