

БИОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, ЭКОЛОГИЯ

УДК 543–4:616.993.192.1:57.08.3.330 (045)

ПОЛУЧЕНИЕ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ТОКСОПЛАЗМОЗА

¹А. К. Булашев, доктор ветеринарных наук, профессор

¹А. Х. Жумалин, магистр сельскохозяйственных наук

¹Ш. С. Серикова, кандидат биологических наук

²М. Ж. Сулейменов, кандидат ветеринарных наук

²Б. А. Шалабаев, кандидат ветеринарных наук

²С. О. Кадыров, кандидат биологических наук

¹Казахский агротехнический университет

им. С. Сейфуллина

²Казахский научно-исследовательский ветеринарный

институт

E-mail: aytbay57@mail.ru

Ключевые слова: токсоплазмоз, *Toxoplasma gondii*, токсоплазмозный антиген, гипериммунизация, токсоплазмозная антисыворотка

Реферат. Приведены результаты изучения иммуногенности, антигенности и специфичности токсоплазмозного антигена, полученного из штамма *Toxoplasma gondii* RH (КазНИВИ), а также возможности его использования в ИФА для серологической диагностики болезни. Для изготовления антигена была использована культура токсоплазмы из суспензии головного мозга, пассажированная через организм мышей. В ходе исследований был отработан метод, позволяющий эффективно аккумулировать паразитарную массу с низким содержанием экссудативных клеток. В результате проведенной работы определены сроки выживаемости культуры токсоплазмы и сохранения ее вирулентных свойств в процессе хранения. Установлено, что использованный штамм паразита сохраняет свою биологическую активность и вирулентность в течение 17 суток хранения при температуре 4°C. Токсоплазмозный антиген обладал достаточной иммуногенностью и позволил получить гипериммунную овечью сыворотку с титром в ИФА 1:51200. В разведении 1:20 препарат давал положительную реакцию в РСК с антисывороткой в титрах 1:5 и 1:10 и не вступал во взаимодействие с антителами, имеющими специфичность к хламидиям, безноитиям и бруцеллам. Изучение белкового состава токсоплазмозного антигена с помощью электрофореза в 10 %-м ПААГ-ДСН показало наличие в нем мажорного белка с молекулярной массой 140 кДа. Коммерческий реагент *Active T. gondi p30 protein fragment (Abcam)*, представляющий собой белок паразита с молекулярной массой 30 кДа, в равной степени реагировал с гипериммунной токсоплазмозной сывороткой, что свидетельствует об антигенном сходстве сравниваемых препаратов. Авторами сделан вывод о возможности использования токсоплазмозного антигена и гипериммунной антисыворотки в разработке иммуноферментных диагностик.

Токсоплазмоз – широко распространенная зоонозная паразитарная инфекция – является одной из причин мертворождений, аборт, ранней детской смертности, слепоты и инвалидности детей, а также причиной бесплодия, абортов, мертво-

рождений, рождения хилого, нежизнеспособного молодняка у домашних, сельскохозяйственных, пушных и промысловых животных. Возбудитель болезни *Toxoplasma gondii* распространен на всех материках, в странах с различными климато-гео-

графическими условиями. Это можно объяснить наличием широкого круга хозяев среди сотен видов млекопитающих и птиц, а также способностью возбудителя паразитировать в клетках тканей фактически всех органов. Экспертами ВОЗ токсоплазмоз включен в число зоонозов, наиболее опасных для здоровья человека, и признан одной из немногих оппортунистических инфекций протозойной этиологии.

Важную роль в качестве источника инфицирования человека играют сельскохозяйственные животные, среди которых более восприимчивыми являются овцы, козы и свиньи. Следовательно, своевременная диагностика инвазии у животных имеет большую актуальность в комплексе мероприятий по профилактике токсоплазмоза у людей.

Основным методом диагностики болезни является паразитологический, который включает световую микроскопию и выделение паразита. Однако метод прямой микроскопии, хотя несложен и доступен, не всегда результативен, а выделение токсоплазм не пользуется широкой популярностью из-за большой трудоемкости и необходимости соблюдения режимных условий при работе с живым возбудителем.

В этой связи определенную перспективу имеют серологические методы диагностики токсоплазмоза [1–3]. В последнее время очевидное предпочтение отдается иммуноферментным методам анализа [4–6]. Общеизвестно, что чувствительность, специфичность и воспроизводимость иммуноферментного анализа (ИФА), в первую очередь, определяются свойством антигена или антител, используемых в данном тесте.

Целью нашей работы явилось изучение антигенности и специфичности токсоплазмозного антигена, приготовленного из штамма *Toxoplasma gondii* RH, а также возможности использования препарата в ИФА для серологической диагностики токсоплазмоза.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Из лабораторных животных были использованы 150 белых мышей, 2 кошки и 2 овцы. Белые мыши были использованы для культивирования штамма *Toxoplasma gondii* RH (коллекция КазНИВИ) и усиления вирулентности токсоплазмы путем перепассажа, а также для отработки метода эффективного накопления паразитарной массы с низким содержанием экссудативных кле-

ток. Кошки были использованы для усиления вирулентности возбудителя. Одна овца с живой массой 30 кг была использована для гипериммунизации токсоплазмозным антигеном для получения антисыворотки, а другая послужила продуцентом отрицательной сыворотки.

Исходным материалом для получения токсоплазмозного антигена служил перитонеальный экссудат. Последний разводили стерильным физиологическим раствором в соотношении 1 : 2. При этом в одном поле зрения микроскопа должно быть не менее 8–10 токсоплазм. Для подавления роста посторонней микрофлоры добавляли пенициллина натриевую соль (500 тыс. ЕД). Смесь выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре и вводили 2–3 белым мышам внутрибрюшинно в дозе 0,2 мл. Через 4–5 суток после заражения мышей вскрывали, собирали внутрибрюшинную жидкость, содержащую токсоплазмы. В стерильных условиях экссудат запаивали в ампулы и хранили при температуре 2–4 °С в течение 10–12 суток до следующего перепассажа.

Повышение вирулентности штамма проводили путем пассажа на мышях суспензии из паренхиматозных органов и головного мозга белых мышей, инвазированных токсоплазмами. Для усиления вирулентности *Toxoplasma gondii* RH на кошках внутрибрюшинный экссудат, полученный от зараженных белых мышей с содержанием свободных токсоплазм 452,0 млн/мл, вводили подкожно первой кошке в объеме 0,5, а второй – 1,0 мл. На 60-й день после заражения кошек подвергали эвтаназии и отбирали кусочки кишечника в качестве патологического материала, из которого готовили суспензию. Последней заражали белых мышей, а затем выделенную культуру пятикратно пассажировали через их организм.

Токсоплазмозный антиген получали по методу, описанному А. Т. Торгаевой [7]. Для изготовления антигена использовали культуру, полученную путем перепассажа через организм мышей токсоплазм из суспензии головного мозга. Специфичность токсоплазмозного антигена определяли в реакции связывания комплемента (РСК) и ИФА.

Очистку препарата осуществляли методом хроматографии с использованием сефакирила S-200 в колонке с объемом 30 мл, длиной 38 см и диаметром 1,5 см. Антигенный спектр препарата устанавливали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН).

Для изучения активности и специфичности токсоплазмозного антигена получали гипериммунную сыворотку овцы по методике А.Н. Халилаева [8] в нашей модификации. Отличие нашей методики заключалось в замене иммуногена – живых токсоплазм на токсоплазмозный антиген. Гипериммунизацию проводили в два цикла с интервалом 30–40 дней. Первую инъекцию антигена делали с адьювантом. Последний готовили путем смешивания вазелинового масла и ланолина в соотношении 3:1, смесь разливали в стерильные флаконы, автоклавировали при 1 атм в течение часа и хранили до употребления в холодильнике при 4°C. К одному объему адьюванта дробно добавляли равный объем антигена и смесь тщательно перемешивали до образования гомогенной массы.

Антиген с концентрацией по белку 1 мг/мл вводили в 4 местах в области расположения подкожных и предлопаточных лимфатических узлов по следующей схеме: первое введение подкожно в дозе 12,0 мл, второе и третье на 7-й и 37-й дни иммунизации внутримышечно в дозе 6,0 мл и четвертое через 7 дней после третьего введения внутривенно в дозе 6,0 мл. Обескровливание животного для получения позитивных сывороток производили на 14–21-й дни после последнего введения антигена. При наличии титра в РСК 1:160 и выше сыворотку считали пригодной для применения. Негативную сыворотку получали от клинически здоровой овцы, реагирующей отрицательно в общепринятых серологических реакциях на токсоплазмоз. Изучение специфичности антигена проводили в сравнении с безноитиозной,

хламидиозной, бруцеллезной сыворотками крови животных (КазНИВИ). В качестве контроля служил токсоплазмозный антиген, приготовленный по методу Ж.К. Омарова и др. [9], а также коммерческие белки возбудителя токсоплазмы, производимые фирмой Abcam: Active T. gondi p30 protein fragment; T. gondi protein fragment и Active T. gondi protein fragment.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клинические признаки болезни у подопытных животных начали проявляться на 4–5-е сутки после заражения. При этом отмечались такие симптомы, как угнетенность, взъерошенность шерсти и парезы задних конечностей. Мышей наркотизировали эфиром и стерильным шприцем отсасывали перитонеальный экссудат, содержащий токсоплазмы. Собранный материал проверяли на наличие токсоплазм путем микроскопирования мазков в неокрашенном виде и хранили в холодильнике в запаянных ампулах при температуре 4°C в течение 14 суток до следующего перепассажа.

Для усиления вирулентности *Toxoplasma gondii* RH экссудат разводили 0,85%-й раствором хлорида натрия так, чтобы в одном поле зрения находилось 4–5 паразитов, затем вводили подкожно белым мышам в объеме 0,2 мл. На 7-е сутки мышей подвергали эвтаназии, а затем из головного мозга и паренхиматозных органов готовили суспензии в физиологическом растворе в соотношении 1:10. Белых мышей в количестве 45 голов разделили на 3 группы по 15 голов в каждой (табл. 1).

Таблица 1

Объем внутрибрюшинного экссудата и содержание в нем форм токсоплазм

Показатели	1-я группа			2-я группа		3-я группа				
						Срок после заражения, сут				
	4	5	6	4	5	4	5	6	7	8
Объем экссудата, мл	0,3±0,05	2,0±0,2	П	2,2±0,2	П	0,94±0,21	1,12±0,1	0,98±0,1	0,2±0,3	П
Свободные токсоплазмы, млн в 1 мл	110±10,5	416,0±15,0	П	550,5±25,5	П	240±5,4	326±15	290±8,8	Деструкция	П
Псевдоцисты, в 1 мл	3020±71,2	2014±95,0	П	1021±45,0	П	2915±120,1	2010±65	1056±92	н.о.	П
Незараженные, здоровые клетки, в 1 мл	3015±73,2	980,0±50,0	П	315,0±33,0	П	3002±123	1813±122	412±38,2	н.о.	П

Примечание. 1-я группа – мыши, зараженные суспензией из паренхиматозных органов; 2-я группа – суспензией из головного мозга; 3-я группа – токсоплазмами 14-суточного хранения; П – падеж животных; н.о. – не обнаружены.

Из табл. 1 видно, что объем экссудата у мышей, инвазированных суспензией из паренхиматозных органов, на 5-е сутки после заражения составил $2,0 \pm 0,2$ мл. В 1 мл экссудата свободные токсоплазмы, псевдоцисты и здоровые экссудативные клетки находились в пределах $416,0 \pm 15,0$ млн; $2014 \pm 95,0$ и $980,0 \pm 50,0$ соответственно. На 5-е сутки после заражения отмечена гибель всех мышей 2-й группы, а их аналоги из 1-й пали на 6-е сутки. При этом объем перитонеального экссудата у мышей 2-й группы был равен $2,2 \pm 0,2$ мл, в 1,0 мл которого содержалось $550,5 \pm 25,5$ млн свободных токсоплазм, что достоверно выше показателя 1-й группы.

При заражении мышей экссудатом 14-уточного хранения внутрибрюшинная жидкость образовалась в меньшем количестве. Так, на 4-е сутки в экссудате объемом $0,94 \pm 0,21$ мл обнаруживались $240 \pm 5,4$ млн свободных токсоплазм, $2915 \pm 120,1$ псевдоцист и 3002 ± 123 здоровых

клеток. На 6-е сутки происходило достоверное уменьшение объема внутрибрюшинной жидкости, свободных в ней токсоплазм и псевдоцист. Наблюдалось существенное снижение количества здоровых клеток. На 7-е сутки объем перитонеального экссудата был минимальным за весь период наблюдения, отмечалась деструкция токсоплазм и отсутствие псевдоцист и здоровых клеток. Через день зарегистрирована гибель всех мышей данной группы.

В дальнейшем провели семь перепассажей штамма токсоплазмы с использованием перитонеального экссудата от мышей 1-й и 2-й групп. На каждый пассаж было использовано по 5 белых мышей. После первого пассажа объем внутрибрюшинной жидкости значительно увеличился и достиг в 1-й группе $2,96 \pm 0,2$ мл. В 1 мл такого экссудата содержались в среднем $496,0 \pm 14,2$ млн свободных паразитов и $310,2 \pm 13,2$ псевдоцист (табл. 2).

Таблица 2

Основные параметры штамма *Toxoplasma gondii* при пассажах в организме белых мышей ($M \pm m$)

Номер пассажа	Группа	Средний объем экссудата, мл	Среднее количество свободных токсоплазм, млн/мл	Среднее количество псевдоцист в 1 мл	Средний срок выживаемости мышей, сут
1	1-я	$2,96 \pm 0,20$	$496,0 \pm 14,2$	$310,2 \pm 13,2$	5
	2-я	$2,70 \pm 0,20$	$482,2 \pm 11,2$	$390,2 \pm 13,2$	6
2	1-я	$2,98 \pm 0,20$	$394,0 \pm 12,3$	$320,0 \pm 8,3$	5
	2-я	$2,72 \pm 0,20$	$398,0 \pm 13,2$	$326,0 \pm 7,9$	5
3	1-я	$2,20 \pm 0,13$	$391,2 \pm 12,1$	$785,2 \pm 26,3$	5
	2-я	$2,07 \pm 0,50$	$387,3 \pm 14,4$	$652,3 \pm 32,3$	5
4	1-я	$1,91 \pm 0,06$	$395,1 \pm 16,2$	$1012,1 \pm 81,9$	5
	2-я	$1,86 \pm 0,15$	$388,5 \pm 6,2$	$998,3 \pm 73,6$	5
5	1-я	$1,23 \pm 0,20$	$405,3 \pm 12,1$	$2010 \pm 72,1$	4
	2-я	$1,09 \pm 0,12$	$375,2 \pm 6,6$	$1098,5 \pm 63,1$	4
6	1-я	$0,71 \pm 0,13$	$362,2 \pm 12,1$	$1963,7 \pm 113,1$	4
	2-я	$0,52 \pm 0,21$	$351,4 \pm 0,97$	$1081,3 \pm 92,1$	3
7	1-я	$0,35 \pm 0,05$	$285,5 \pm 13,2$	$1925,0 \pm 112,0$	3
	2-я	$0,28 \pm 0,13$	$305,2 \pm 11,5$	$1042,3 \pm 62,1$	3

Из табл. 2 следует, что экссудат мышей 2-й группы при статистически равном объеме ($2,7 \pm 0,2$ мл) и одинаковом количестве свободных токсоплазм имел больше псевдоцист ($390,2 \pm 13,2$).

На 2–4-м пассажах количество перитонеального экссудата в сравниваемых группах имело тенденцию к уменьшению. Лабораторные животные обеих групп пали на 5-е сутки после заражения. Последующие пассажи привели к резкому снижению объема внутрибрюшинной жидкости и гибели мышей уже на 3–4-е сутки. Так, например, объем перитонеального экссудата с 5-го по 7-й пассажи уменьшился с $1,23 \pm 0,2$ до $0,28 \pm 0,13$ мл,

а количество свободных токсоплазм снизилось с $405,3 \pm 12,1$ до $285,5 \pm 13,2$ млн. В течение 5–7-го пассажей количество псевдоцист у мышей обеих групп оставалось на одном уровне. На 6–7-м пассажах гибель животных сравниваемых групп отмечалась уже на 3-и сутки. Результаты исследований свидетельствуют о том, что с увеличением количества пассажей происходит закономерное усиление вирулентных свойств токсоплазм, на что указывает уменьшение срока жизни лабораторных животных.

На 40–50-й день после заражения кошек комплементсвязывающие антитела определялись

в сыворотке крови до титров 1 : 5 – 1 : 10. Суспензия патматериала, приготовленная из кишечника кошек, была инъецирована подкожно белым мышам в количестве 10 голов. Клинические признаки токсоплазмоза (угнетение, отказ от корма и воды) появились на 6–7-е сутки после заражения. Из них 5 голов подвергли эвтаназии, приготовили суспензию из головного мозга и провели 5 пассажей через организм белых мышей. После 4-го пассажа мыши пали на 3–4-е сутки, что свидетельствует об усилении вирулентности штамма *Toxoplasma gondii*, полученного от зараженных кошек.

Вирулентные свойства, а также сроки выживаемости культур токсоплазмы изучали при их хранении в перитонеальном экссудате зараженных белых мышей в ампулах при температуре 4°C. На 7, 10, 14, 17 и 21-е сутки хранения из содержимого ампул готовили взвесь паразитов на физиологическом растворе. При этом в одном поле зрения микроскопа содержалось от трех до пяти токсоплазм. На каждый опыт использовали по пять белых мышей. В группах мышей, заражен-

ных содержимым ампул 7-, 10-, 14- и 17-суточно-го хранения, клинические признаки заболевания проявились на 6–7-е сутки, а гибель отмечалась на 10-е сутки. Падеж среди животных, инвазированных экссудатом со сроком хранения 21 сутки, не зарегистрирован.

Активность токсоплазмозного препарата изучали в сравнении с антигеном, приготовленным по методу Ж. К. Омарова и др. [9], используя гипериммунную антисыворотку овцы (табл. 3).

Результаты РСК свидетельствуют о том, что оба препарата обладают высокой равнозначной антигенной активностью в разведениях 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 по отношению к токсоплазмозной антисыворотке и не вступают в реакцию с негативной сывороткой.

Специфичность антигена определяли в РСК, используя полученную гипериммунную токсоплазмозную сыворотку, а также безноитиозную, хламидиозную и бруцеллезную сыворотки. Результаты серологических исследований приведены в табл. 4.

Таблица 3

Активность токсоплазмозного антигена в РСК

Наименование	Токсоплазмозный антиген, приготовленный					
	по методу А. Т. Торгаевой			по методу Ж. К. Омарова		
	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 5	1 : 10	1 : 20
Токсоплазмозная сыворотка овцы						
1 : 5	++++	++++	+++	++++	+++	++
1 : 10	++++	++++	+++	++++	+++	++
Сыворотка негативная						
1 : 5		-	-	-	-	-
1 : 10	-	-	-	-	-	-
Контроль (физраствор)	-	-	-	-	-	-

Таблица 4

Оценка специфичности токсоплазмозного антигена в РСК

Сыворотка	Разведение сыворотки	Разведение антигена				
		1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80
Токсоплазмозная сыворотка овцы	1 : 5	++++	++++	+++	+	-
	1 : 10	++++	++++	+++	+	-
Хламидиозная положительная	1 : 5	-	-	-	-	-
	1 : 10	-	-	-	-	-
Безноитиозная положительная	1 : 5	-	-	-	-	-
	1 : 10	-	-	-	-	-
Бруцеллезная	1 : 5	-	-	-	-	-
	1 : 10	-	-	-	-	-
Сыворотка негативная	1 : 5	-	-	-	-	-
	1 : 10	-	-	-	-	-
Контроль (физраствор)	-	-	-	-	-	-

Таблица 5

Антигенность препаратов *Toxoplasma gondii* в ИФА (показатели оптической плотности, 450 нм)

Разведение антисыворотки	Виды антигенов <i>Toxoplasma gondii</i>			
	Токсоплазмозный антиген	Active T. gondi p30 protein fragment	T. gondi protein fragment	Active T. gondi protein fragment
1 : 100	0,457	0,788	0,016	0,036
1 : 200	0,427	0,621	0,065	0,079
1 : 400	0,306	0,513	0,038	0,041
1 : 800	0,314	0,490	0,023	0,022
1 : 1600	0,285	0,438	0,004	0,006
1 : 3200	0,267	0,377	-0,001	-0,002
1 : 6400	0,199	0,302	-0,003	-0,005
1 : 12800	0,153	0,277	-0,002	0,001

Примечание. Твердая фаза была сенсibilизирована использованными антигенами в концентрации 10 мкг/мл.

Таблица 6

Определение оптимальной концентрации токсоплазмозного антигена для непрямого ИФА

Разведение овечьей антисыворотки 1 : 100	Виды антигенов токсоплазм	Концентрация белка, использованного для сенсibilизации твердой фазы полистироловой панели, мкг/мл			
		10,0	5,0	2,5	1,25
1 : 100	Токсоплазмозный антиген	++++	++++	++++	+++
	Active T. gondii p30 protein fragment	++++	++++	++++	+++
1 : 200	Токсоплазмозный антиген	++++	++++	++++	+++
	Active T. gondii p30 protein fragment	++++	++++	++++	+++
1 : 400	Токсоплазмозный антиген	++++	++++	++++	+++
	Active T. gondii p30 protein fragment	++++	++++	++++	+++
1 : 800	Токсоплазмозный антиген	++++	++++	++++	+++
	Active T. gondii p30 protein fragment	++++	++++	++++	+++
1 : 1600	Токсоплазмозный антиген	++++	++++	++++	++
	Active T. gondii p30 protein fragment	++++	++++	++++	++
1 : 3200	Токсоплазмозный антиген	++++	++++	++++	++
	Active T. gondii p30 protein fragment	++++	++++	++++	++
1 : 6400	Токсоплазмозный антиген	++++	++++	+++	++
	Active T. gondii p30 protein fragment	++++	++++	+++	++
1 : 12800	Токсоплазмозный антиген	++++	++++	+++	++
	Active T. gondii p30 protein fragment	++++	++++	+++	++
1 : 25600	Токсоплазмозный антиген	++++	++++	+++	++
	Active T. gondii p30 protein fragment	+++	+++	+++	+
1 : 51200	Токсоплазмозный антиген	++++	+++	++	+
	Active T. gondii p30 protein fragment	+++	++	+	-
1 : 102400	Токсоплазмозный антиген	++	+	-	-
	Active T. gondii p30 protein fragment	+	-	-	-

Как видно из табл. 4, приготовленный токсоплазмозный антиген показал специфичность в РСК только к антителам сыворотки гипериммунизированной овцы. Например, антиген в разведении 1:20 давал положительную реакцию с оценкой в три креста с антисывороткой в титрах 1:5 и 1:10 и не вступал во взаимодействие с антителами, имеющими специфичность к хламидиям, безноитиям и бруцеллам.

Результаты изучения антигенности токсоплазмозного препарата и коммерческих реагентов в ИФА представлены в табл. 5.

Из табл. 5 следует, что приготовленный нами токсоплазмозный антиген и коммерческий препарат Active T. gondi p30 protein fragment показали весьма высокую антигенность, вступая в реакцию с антителами овечьей антисыворотки включительно до титра 1:12800 (максимальное разведение антисыворотки, использованное при

постановке ИФА). Два остальных коммерческих антигена *T. gondi* protein fragment и Active *T. gondi* protein fragment не распознавались гипериммунной сывороткой.

Препарат фирмы Abcam Active *T. gondi* p30 protein fragment представляет собой иммунодоминантный поверхностный антиген токсоплазмы, p30 является основным поверхностным антигеном *T. gondii*. Это весьма представительный белок, который встречается в большинстве штаммов паразита. Белок найден как в везикулярной сети паразитофорных вакуолей, так и на поверхности возбудителя, и как иммуногенный компонент вызывает усиленное антителообразование у инвазированных лиц. Согласно описанию препаратов, они иммунореактивны по отношению к антителам сыворотки крови лиц, инвазированных *T. gondi*. Препараты *T. gondi* protein fragment и Active *T. gondi* protein fragment представляют собой участок из 72 аминокислот (от 234 до 306)

белка токсоплазмы, природа которого не указана в каталоге фирмы.

Для определения предельного титра антисыворотки по отношению к использованным препаратам *T. gondi* и установления их оптимальной концентрации, необходимой для покрытия твердой фазы, был проведен ИФА с использованием полученного нами токсоплазмозного антигена и Active *T. gondi* p30 protein fragment (Abcam) с различным содержанием препаратов по белку. Результаты считали положительными при показателях оптической плотности жидкости в лунках планшета для ИФА с оценкой не менее чем в два креста (табл. 6).

Из данных табл. 6 видно, что оптимальной концентрацией токсоплазмозного антигена, при которой происходит максимальное покрытие твердой фазы, является 5,0 мкг/мл. При этом антиген обнаруживался гипериммунной сывороткой с оценкой в три креста до разведения 1 : 51200.

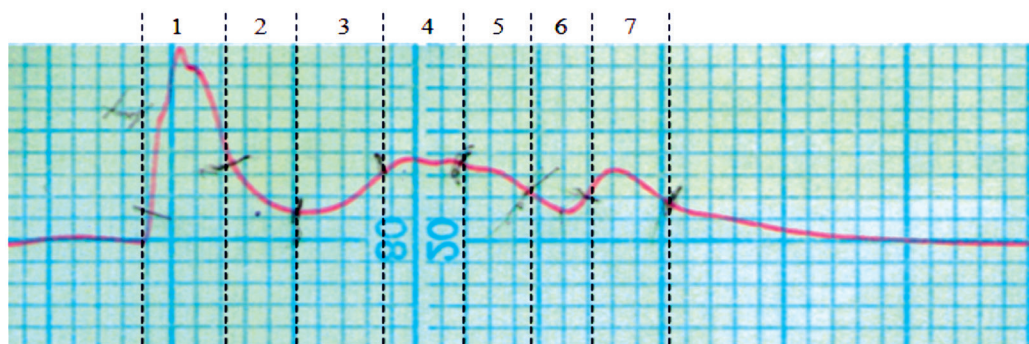


Рис. 1. Хроматография токсоплазмозного антигена:

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – фракции токсоплазмозного антигена

Результаты хроматографии токсоплазмозного антигена представлены на рис. 1.

Хроматографическое разделение препарата дало 3 основных пика, которые были собраны по фракциям. При этом первый пик был разделен на две, второй пик – на три, а третий пик – на две фракции. Активность фракций отдельных пиков была определена в непрямом варианте ИФА с использованием гипериммунной антисыворотки. Последняя раститровывалась в 16 лунках, сенсibilизированных отдельными фракциями антигена, начиная с разведения 1:100. Результаты считали положительными при показателях оптической плотности жидкости в лунках планшета для ИФА с оценкой не менее чем в два креста (табл. 7).

Результаты ИФА свидетельствуют о том, что антигенную активность имеют обе фракции первого и второго пиков. Антитела гипериммун-

ной сыворотки связывались с белками указанных фракций в титрах от 1 : 100 до 1 : 400. Фракция № 2 третьего пика не выявлялась антисывороткой.

Белковый состав токсоплазмозного антигена и его отдельных фракций определяли с помощью электрофореза в 10%-м ПААГ-ДСН. Электрофореграмма препаратов представлена на рис. 2.

Электрофореграмма показала, что в составе токсоплазмозного антигена имеется один мажорный белок с молекулярной массой 140 кДа. Данная белковая полоса обнаруживалась и в составе двух фракций первого пика антигена. Коммерческий препарат токсоплазмы Active *T. gondi* p30 protein fragment (Abcam) образовал в электрофореграмме белковую полосу, соответствующую его молекулярной массе (30 кДа).

Таблица 7

Активность отдельных фракций токсоплазмозного антигена в ИФА

ЕБА		Фракция № 1, первый пик		Фракция № 2, первый пик		Фракция № 1, второй пик		Фракция № 2, второй пик		Фракция № 2, третий пик	
-	-	+++		+++	-	++++	-	++++	-	-	-
-	-	++	-	++	-	+++	-	++++	-	-	-
-	-	++	-	++	-	++	-	+++	-	-	-
-	-	+	-	+	-	++	-	++	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Примечание. ЕБА – единый бруцеллезный антиген.

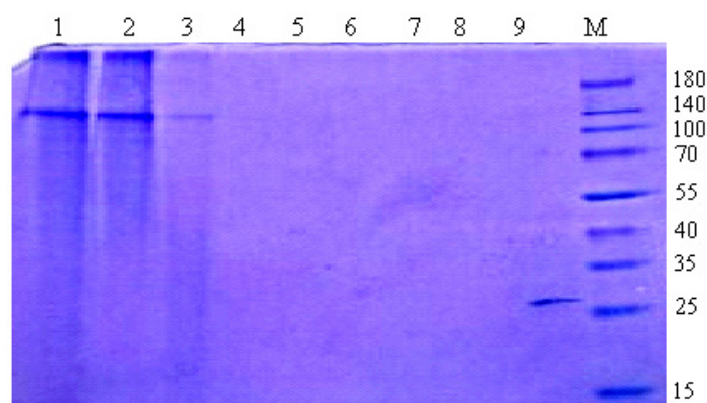


Рис. 2. Электрофореграмма токсоплазмозного антигена:

1 – сырой токсоплазмозный антиген; 2 – фракция № 1 первого пика; 3 – фракция № 2 первого пика; 4 – фракция № 1 второго пика; 5 – фракция № 2 второго пика; 6 – фракция № 3 второго пика; 7 – фракция № 1 третьего пика; 8 – фракция № 2 третьего пика; 9 – антиген Active T. gondi p30 protein fragment; М – маркерные белки: 180; 140; 100; 70; 55; 40; 35; 25 и 15 кДа (Thermo Scientific, США)

ВЫВОДЫ

1. Штамм *Toxoplasma gondii* (КазНИВИ) сохраняет свою биологическую активность и вирулентность в течение 17 суток хранения при температуре 4°C.
2. Отработан метод эффективного накопления паразитарной массы *Toxoplasma gondii* с низким содержанием экссудативных клеток.
3. Получен токсоплазмозный антиген, в составе которого имеется мажорный белок с молеку-

- лярной массой 140 кДа, обладающий высокой иммуногенностью, выраженной антигенностью и достаточной специфичностью.
4. Разработан метод гипериммунизации животных-продуцентов токсоплазмозным антигеном для получения специфической антисыворотки.
5. Токсоплазмозный антиген и гипериммунная антисыворотка могут быть использованы в разработке серологических методов диагностики токсоплазмоза на основе ИФА.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Воробьева М.Н. Совершенствование ретроспективной диагностики токсоплазмоза кошек и собак: дис. ... канд. вет. наук. – Казань, 2007. – 125 с.
2. Ghazy A. A., Shaapan R. M., Abdel-Rahman E. H. Comparative serological diagnosis of toxoplasmosis in horses using locally isolated *Toxoplasma gondii* // Veterinary Parasitology. – 2007. – Vol. 14, N 1–2. – P. 31–36.

3. *Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis* / O. Villard, B. Cimon, J. Franck [et al.] // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2012. – Vol. 73, N 3. – P. 231–235.
 4. *Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against Toxoplasma gondii in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep* / R. Edelhofer, F. Grimm, P. Deplazes, W. Basso // *Parasit. Vectors*. – 2013. – Vol. 5, N 6. – P. 85. – doi: 10.1186/1756-3305-6-85.
 5. *Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of Toxoplasma gondii infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach* / W. Basso, S. Hartnack, L. Pardini [et al.] // *Int. J. Parasitol.* – 2013. – Vol. 43, N 7. – P. 565–570.
 6. Al-Adhami B.H., Gajadhar A.A. A new multi-host species indirect ELISA using protein A/G conjugate for detection of anti-Toxoplasma gondii IgG antibodies with comparison to ELISA-IgG, agglutination assay and Western blot // *Vet. Parasitol.* – 2014. – Vol. 200, N 1–2. – P. 66–73.
 7. Торгаева А.Т., Ильгекбаева Г.Д. Предварительный патент РК № 12343. Способ получения токсоплазменного антигена для серологической диагностики; опубл. 17.12.2002, Бюл. № 12. – 4 с.
 8. Халилаев А.Н. Способы получения иммунных сывороток для изучения антигенов токсоплазм и безноитий: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1982. – 15 с.
 9. Омаров Ж.К., Боровиков А.А., Красов Б.М. Способ получения токсоплазменного антигена: описание изобретения к авторскому свидетельству № 533376; заявл. 31.08.1973; опубл. 30.10.1976, Бюл. № 40. – 4 с.
-
1. Vorob'eva M.N. *Sovershenstvovanie retrospektivnoy diagnostiki toksoplazmoza koshek i sobak* [dis. ... kand. vet. nauk]. Kazan', 2007. 125 p.
 2. Ghazy A.A., Shaapan R.M., Abdel-Rahman E.H. *Comparative serological diagnosis of toxoplasmosis in horses using locally isolated Toxoplasma gondii* [Veterinary Parasitology], Vol. 14, no. 1–2 (2007): 31–36.
 3. Villard O., Cimon B., Franck J. et al. *Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis* [Diagnostic Microbiology and Infectious Disease], Vol. 73, no. 3 (2012): 231–235.
 4. Edelhofer R., Grimm F., Deplazes P., Basso W. *Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against Toxoplasma gondii in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep* [Parasit. Vectors], Vol. 5, no. 6 (2013): 85. doi: 10.1186/1756-3305-6-85.
 5. Basso W., Hartnack S., Pardini L. et al. *Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of Toxoplasma gondii infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach* [Int. J. Parasitol], Vol. 43, no. 7 (2013): 565–570.
 6. Al-Adhami B.H., Gajadhar A.A. *A new multi-host species indirect ELISA using protein A/G conjugate for detection of anti-Toxoplasma gondii IgG antibodies with comparison to ELISA-IgG, agglutination assay and Western blot* [Vet. Parasitol], Vol. 200, no. 1–2 (2014): 66–73.
 7. Torgaeva A.T., Il'gekbaeva G.D. *Predvaritel'nyy patent RK № 12343. Sposob polucheniya toksoplazmennogo antigena dlya serologicheskoy diagnostiki* [opubl. 17.12.2002], Byul. no. 12. 4 p.
 8. Khalilaev A.N. *Sposoby polucheniya immunnykh syvorotok dlya izucheniya antigenov toksoplazm i beznoitiiy* [avtoref. dis. ... kand. biol. nauk]. Moscow, 1982. 15 p.
 9. Omarov Zh.K., Borovikov A.A., Krasov B.M. *Sposob polucheniya toksoplazmennogo antigena* [opisanie izobreteniya k avtorskomu svidetel'stvu № 533376; zayavl. 31.08.1973; opubl. 30.10.1976], Byul. no. 40. 4 p.

REACTIVE CHEMICALS IN SEROLOGIC DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS

Bulashev A.K., Zhumalin A. Kh., Serikova Sh.S., Suleymenov M. Zh., Shalabaev B.A., Kadyrov S.O.

Key words: toxoplasmosis, Toxoplasma gondii, toxoplasmic antigen, hyperimmunization, toxoplasmic antiserum

Abstract. The article reveals the results on studying immunological potency, immunogenicity and specific features of toxoplasmic antigen received from Toxoplasma gondii RH culture and its applying in immune-enzyme analysis in order to make serological diagnosis. The authors applied toxoplasma produced from serebrum suspension and passed through the mice organisms in order to receive antigen. The research trained

the method which allows accumulating parasitic mass with low concentration of exudative cells. The paper defines survival of toxoplasma and protection its virulent properties in keeping. The authors certify that used parasitic strain keeps biological activity and virulence during 17 days at 40C. Toxoplasmic antigen was of high immunological potency and allowed receiving hyperimmune sheep serum at 1 : 51200 titer in immune-enzyme analysis. The specimen 1 : 10 solution responses positively with antiserum at 1 : 5 titer and 1 : 10 in immune-enzyme analysis; it didn't affect antibodies subject to chlamidia, besnoitia and brucella. Studying protein concentration of toxoplasmic antigen by means of electrophoresis showed major protein with molecular mass 140 kilodalton. The research demonstrates that reactive chemical Active T.gondi p30 protein fragment (Abcam) applied as parasitic protein with molecular mass 30 kilodalton responded equally to hyperimmune toxoplasmic serum; this certifies antigen similarity of the specimens compared. The authors conclude there is a possibility to apply toxoplasmic antigen and hyperimmune antiserum in development of immune-enzyme diagnosis.

УДК 636.5.082.474:591.3

РОСТ И РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ КУР ПРИ ТЕПЛОВОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ЙОДИРОВАННОГО ТРАНСОВАРИАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Е. Н. Индюхова, аспирант

Т. О. Азарнова, доктор биологических наук

В. И. Максимов, доктор биологических наук, профессор
Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологий им. К. И. Скрябина

E-mail: zxcv33980@yandex.ru

Ключевые слова: йодсодержащий препарат, тепловой стресс, цыпленок, тиреоидные гормоны, липопероксидация

Реферат. В ходе исследования установлено, что длительное тепловое воздействие во время инкубации на зародышей кур вызывает выраженную стрессовую реакцию в их организме, о чем свидетельствует повышенный уровень продуктов перекисного окисления липидов и низкие значения антиокислительной активности крови молодняка суточного возраста. Установлено, что негативное влияние длительного перегрева в период инкубации можно корректировать двукратной обработкой яиц йодсодержащим препаратом (до инкубации и на 19-е сутки). Эмбрионы кур в опытной группе на 4-й день инкубации имели лучшие показатели развития сердечно-сосудистой системы, чем в контроле. Так, большой и малый диаметры сосудистого поля достоверно больше на 20,8 и 22,9 % соответственно по сравнению с контролем. На 8-, 12- и 16-е сутки инкубации отмечено достоверное увеличение длины и массы тела опытных особей. Результаты эксперимента показали, что препарат стимулировал антиоксидантные возможности организма зародышей путём активизации биосинтеза гормонов в щитовидной железе (в пределах референтных значений), что определило интенсификацию роста и развития эмбрионов кур. Незначительные различия по уровню тиреотропного гормона и более значимые изменения в содержании гормонов щитовидной железы между контролем и опытом указывают на то, что препарат оказывает эффективное воздействие на работу щитовидной железы. Достоверно большие значения массы и длины тела молодняка суточного возраста из опытной группы по сравнению с контролем свидетельствуют о физиологической полноценности данного молодняка. Также физиологическая зрелость цыплят подтверждается наибольшей ректальной температурой, что коррелирует с калоригенной активностью тиреоидных гормонов.

Стресс не без основания привлекает пристальное внимание исследователей различных отраслей биологии, медицины и ветеринарии. Актуальными остаются вопросы компенсации нарушений физиологических функций при данном явлении [1]. При стрессах неизбежны чрезмерные

затраты жизненно важных биологически активных веществ, в частности способных оптимизировать энергетические потери, в том числе в митохондриальной дыхательной цепи, что непременно наблюдается при развитии оксидативного стресса. Поэтому среди препаратов, применяемых для ком-