

ИНАКТИВАЦИЯ ИНФЕКЦИОННОСТИ ГРИБА HISTOPLASMA FARCIMINOSUM**Б.А. Еспембетов**, зав. лабораторией, кан. вет. наук**Н.Н. Зинина**, вед. науч. сотр., кандидат вет. наук**Е.Б. Серікбай**, старший лаборант, бакалавр**М.К. Сармыкова**, науч. сотр., магистр вет. наук**К.К. Тилеуханов**, старший лаборант, магистр биологии**Л.С. Тойтанова**, старший лаборант, бакалавр**Н.С. Сырым**, ст. науч. сотр., канд. вет. наук**Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности****(Казахстан, пгт. Гвардейский)**

DOI:10.24412/2500-1000-2022-7-1-151-157

Аннотация. В данной статье представлены результаты подбора инактивантов для вакцины против лимфангоита лошадей. Для отработки параметров инактивации гриба *Histoplasma farciminosus* были применены различные инактиванты, как ДЭИ (N,N-диметилэтилендиамина), бета-ПРОПИОЛАКТОН, формальдегид, спирт, глютакс и анолит. При этом были установлены и оптимальная конечная концентрация инактиванта бета-ПРОПИОЛАКТОН 0,5%, температура реакционной среды ($22\pm 3,0$) °C, pH 7,4-7,6, продолжительность инактивации 600 мин.

Ключевые слова: лимфангоит, лошади, инактивант, гриб, *Histoplasma farciminosus*, инактивация, вакцина, штамм.

1. Введение. Эпизоотический лимфангоит – хронически протекающая инфекционная болезнь однокопытных, характеризующаяся воспалением лимфатических сосудов кожи и подкожной клетчатки с образованием гнойных фокусов и язв. Возбудитель болезни – гриб *Histoplasma farciminosum*. Гриб проникает в организм лошадей через поврежденную кожу (царапины, ссадины, раны, наминки и др.) и локализуется в лимфатических сосудах, подкожной клетчатке и собственно коже.

Источником возбудителя инфекции служат больные животные, выделяющие во внешнюю среду вместе с гноем язв множество криптококков. Факторами передачи возбудителя считают: навоз, подстилку, сено и другие субстраты, загрязненные выделениями больных животных. Передача заразного начала от больных животных здоровым происходит как при прямом контакте, так и через посредство предметов конского ухода и снаряжения [1, 2, 3].

Диагноз устанавливали на основании комплекса эпизоотологических, клинических данных, патологоанатомических изменений, серологических исследований

образцов сыворотки крови и микроскопических – экссудата из гнойных язв и содержимого утолщенных лимфатических сосудов [4, 5, 6].

Профилактика сводится к проведению карантина, вновь завезенного конепоголовья, недопущению травматизма, комплектации лошадей из благополучных зон, регулярных осмотров, профилактического исследования, диспансеризации.

Коммерческих вакцин против эпизоотического лимфангоита не существует, хотя некоторые сообщения свидетельствуют о том, что живые и инактивированные вакцины были испытаны (и, возможно, использованы) в некоторых эндемичных регионах (например, в нашей республике и Китае) и оказались многообещающими.

В связи с этим одними из важнейших требований сегодняшнего дня являются разработка вакцин против эпизоотического лимфангоита лошадей.

Эффективность вакцин, вызывающих стойкий напряженный иммунитет и сокращения сроков создания защитного иммунитета зависит не только от количества и качества антигена, но и от подобранных инактивантов и адьювантов способных

усиливать процесс иммунизации. В связи с этим исследования по включению различных типов инактивантов и адъювантов в составе вакцин также является весьма актуальными.

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что поиск наиболее эффективных инактивантов остается одним из актуальных вопросов в производстве вакцин против лимфангоита лошадей [7, 8, 9, 10].

В настоящее время представляют большой интерес современные коммерческие инактиванты, как ДЭИ (N,N-диметилэтилендиамина), бета-ПРОПИОЛАКТОН, 35% формальдегид, 90% спирт, 4% глютакс и 0,5% анолит.

Широко применяемый для инактивации вирусов формальдегид обладает такими отрицательными свойствами, как повышенная токсичность, реактогенность и иммунодепрессия. Для их преодоления необходима нейтрализация формалина, что увеличивает стоимость вакцины и в то же время усложняет технологический процесс ее изготовления.

Исходя из вышеизложенного, для выбора наиболее оптимального инактиванта, целью настоящих исследований было сравнительное изучение инактивирующего действия вышеуказанных инактивантов на грибок *Histoplasma farciminosus*.

2. Материалы и методы исследований

В процессе выполнения этой задачи использованы коммерческие инактиванты 15% ДЭИ (N,N-диметилэтилендиамина), 98% бета-ПРОПИОЛАКТОН, 35% формальдегид, 90% спирт, 4% глютакс и 0,5% анолит. Для этого в стеклянных бутылках в день составления вакцины, исходя из исходной концентрации инактиванта, готовили разные концентрации растворов на стерильной дистиллированной воде. Были изучены параметры инактивации (концентрация, экспозиция).

Для инактивации суспензии *Histoplasma farciminosum* использовали вышеуказанные инактиванты. Перед добавлением инактиванта, температуру грибосодержащей суспензии доводили до $(22 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. После чего, в суспензию добавляли разные концентрации рабочих растворов инакти-

вантов до конечной концентрации 0,5-6%. Затем устанавливали pH суспензии в пределах 7,2-7,4. Инактивацию гриба проводили при температуре $(22 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, в течение 10 ч с периодическим перемешиванием (5 мин. с интервалом 2 ч).

Далее применяли тиосульфат натрия (натрий серноватистокислый), который использовали для нейтрализации инактивантов. В бутылку, содержащую 500 мл дистиллированной воды, вносили 250 г тиосульфата натрия. После растворения тиосульфата натрия, объем раствора доводили дистиллированной водой до 1,0 л и тщательно перемешивали. Раствор стерилизовали в автоклаве при 120°C текучим паром в течение 45 мин.

Отбор проб проводили через каждые 2 ч для последующего проведения «слепых» последовательных пассажей на питательной среде Сабуро.

Инфицированные чашки Петри инкубировали при температуре $(28 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Одновременно ставили контроль. За инфицированными чашками Петри проводили ежедневное наблюдение в течение 7 суток отмечали отсутствие роста.

Антиген считали полностью инактивированным при условии отсутствия роста грибка на питательной среде Сабуро на протяжении трех последовательных пассажей.

Проверку полноты инактивации *Histoplasma farciminosum* проводили на клинически здоровых мышах. С этой целью опытным животным вводили инактивированный материал. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Мыши должны оставаться живыми в течение 14 суток наблюдения.

3. Результаты исследований.

В процессе выполнения этой задачи использованы коммерческие инактиванты 15% ДЭИ (N,N-диметилэтилендиамина), 98% бета-ПРОПИОЛАКТОН, 35% формальдегид, 90% спирт, 4% глютакс и 0,5% анолит. Для этого в стеклянных бутылках в день составления вакцины, исходя из исходной концентрации инактиванта, готовили разные концентрации растворов на стерильной дистиллированной воде. Были изучены параметры инактивации

(концентрация, экспозиция). Проведенные исследования по подбору инактивантов приведенные в таблице 1.

Таблица 1. Подбор инактивантов для создания вакцины

Конечная концентрация инактиванта, %	Время, мин	Наличие (+) или отсутствие (-) рост гриба <i>Histoplasma facirminosus</i>		
		Жидкая среда Сабуро	Плотная среда Сабуро	Контроль
15% N,N-диметилэтилендиамин ДЭИ				
8,0	60	+	+	+
2,0	120	+	+	+
3,0	180	+	+	+
4,0	240	+	+	+
5,0	300	+	+	+
6,0	360	+	+	+
98% бета-ПРОПИОЛАКТОН				
0,5	60	+	—	—
1	120	—	—	—
2	180	—	—	—
3	240	—	—	—
4	300	—	—	—
5	360	—	—	—
35% Формальдегид				
0,5	60	—	—	—
1	120	—	—	—
2	180	—	—	—
3	240	—	—	—
4	300	—	—	—
5	360	—	—	—
90% Спирт				
40	60	—	—	—
45	120	—	—	—
50	180	—	—	—
60	240	—	—	—
70	300	—	—	—
80	360	—	—	—
4% Глютекс				
0,25	60	—	—	—
0,5	120	—	—	—
1,0	180	—	—	—
2,0	240	—	—	—
3,0	300	—	—	—
3,5	360	—	—	—
0,5% Анолит				
0,5	60	—	—	—
	120	—	—	—
	180	—	—	—
	240	—	—	—
	300	—	—	—
	360	—	—	—

Результаты таблицы 1, свидетельствуют о высокой инактивирующей активности всех инактивантов, кроме ДЭИ. Экспозиции действия инактивантов на штаммы гриба составили: 60, 120, 180, 240, 300, 600 мин. Концентрации инактивантов также были разные: 0,25% 0,5%; 1%; 2%; 3%;

4%; 5%. Температура инактивации ($22 \pm 0,5$) °С, с периодическим перемешиванием через каждые 2 и 3 часа по 3-5 минут.

За инфицированными чашками Петри проводили ежедневное наблюдение в течение 7 суток и отмечали отсутствие роста.

В результате проведенных экспериментов по подбору эффективных инактиваторов решили остановить свой выбор на глутексе, анолите и особенно на бета-ПРОПИОЛАКТОНе. Выбор 98% бета-ПРОПИОЛАКТОНа в качестве инактиванта для штаммов *Histoplasma farciminosum* обоснован тем, что в ряде зарубежных ли-

тературных источниках, а также согласно нашим данным бетапропилактон обладает способностью полного лишения инфекционности гриба при максимальном сохранении антигенных свойств (в конечной концентрации 0,5% инактивировали при температуре $(22 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Инактивацию проводили ровно до 600 мин (табл. 2).

Таблица 2. Подбор концентрации и экспозиции бета-ПРОПИЛАКТОНА

Питательные среды	Экспозиция (мин)					
	1	2	3	4	5	10
0,5 % бета-ПРОПИОЛАКТОН						
Жидкая среда Сабуро	+	—	—	—	—	—
Плотная среда Сабуро	+	—	—	—	—	—
Контроль	+	+	+	+	+	+
1,0 % бета-ПРОПИОЛАКТОН						
Жидкая среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Плотная среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Контроль	+	+	+	+	+	+
2,0 % бета-ПРОПИОЛАКТОН						
Жидкая среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Плотная среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Контроль	—	—	—	—	—	—
3,0 % бета-ПРОПИОЛАКТОН						
Жидкая среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Плотная среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Контроль	+	+	+	+	+	+
4,0 % бета-ПРОПИОЛАКТОН						
Жидкая среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Плотная среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Контроль	+	+	+	+	+	+
5,0 % бета-ПРОПИОЛАКТОН						
Жидкая среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Плотная среда Сабуро	—	—	—	—	—	—
Контроль	+	+	+	+	+	+

Примечание: наличие (+) или отсутствие (-) рост гриба *Histoplasma facirminosus*

Таблица 3. Изучение инактивирующего действия бета-ПРОПИЛАКТОНА

Инактиватор, мл	Конечная концентрация инактиванта в материале, %	Время и результаты инактивации, час				
		2	4	6	8	10
бета-ПРОПИОЛАКТОН	0,5	10 мл добавили в общий объем ГСС				
25% р-р тиосульфата натрия, мкл	200	50	50	50	50	50
Слепые последовательные пассажи на питательной среде Сабуро	3 чашки Петри	3	3	3	3	3
	2 чашки Петри контроль (1 с культурой <i>Histoplasma farciminosum</i> на питательной среде и 1 без культуры с пит. среды)					
Итого	5 чашек					

Для определения полноты инактивации грибосодержащей культуральной жидкости при температуре $(22 \pm 3,0)^\circ\text{C}$ конечными концентрациями бета-ПРОПИОЛАКТОН 0,5% проводили согласно методике (рис. 1).

Так же полноты инактивации грибосодержащей суспензии (присутствие или от-

сутствие в данном образце микроорганизмов) параллельно проводили исследования на автоматическом анализаторе культур ВАСТ/ALERT 3D в течении 7 суток (рис. 2). Результаты приведены в рисунках 1-4.

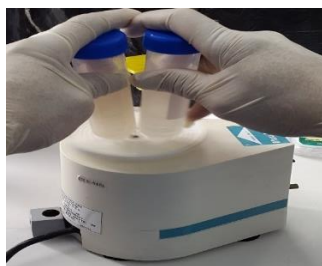


Рис. 1. Соединение грибной суспензий с инактиватором с помощью вортекса и биологической мешалки



Рис. 2. Автоматический анализатор BacT/ALERT

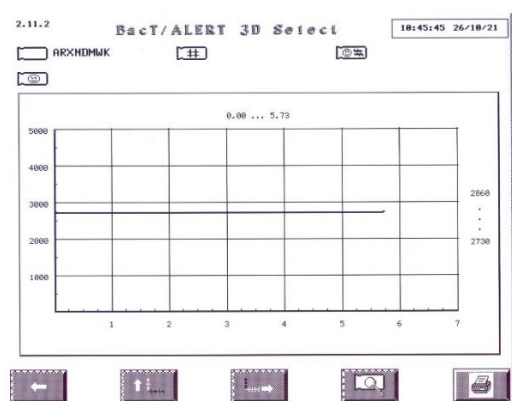


Рис. 3. *Histoplasma farciminosum* «Т» с инактиватором 0,5% бета-ПРОПИОЛАКТОН через 10 ч. (600 мин.)

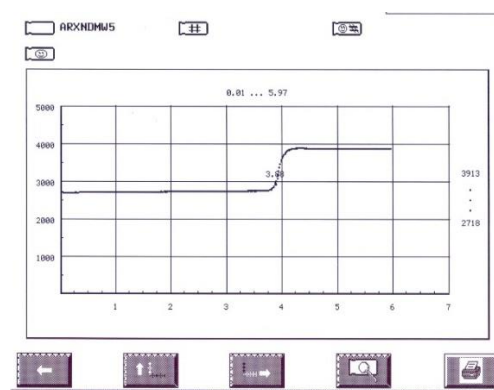


Рис. 4. Контроль – грибосодержащая суспензия *Histoplasma farciminosum* «Т» без инактиванта

Как видно из рисунков 1-4, на основании опытов, проведенных на автоматическом анализаторе BacT/ALERT, концентрация 0,5%-ного бета-ПРОПИОЛАКТОНа при экспозиции 60 мин, температуре 22 °С не является приемлемыми параметрами полноты инаktivации. Однако, 0,5% концентрация бета-ПРОПИОЛАКТОНа с температурой 22 °С при экспозиции 10 часов и более мин является оптимальными параметрами для инаktivации грибной суспензии.

Подготовленные пробы материала (три инаktivированные при $(22 \pm 3,0)$ °С на сле-

дующем этапе исследований использовали для полноты определения инаktivации на белых мышах. С этой целью сформировали 5 групп животных по 3 головы в каждой: четыре группы опытных и одна группа контрольная. Мышам опытных групп вводили инаktivированные пробы материала, мышам контрольной группы – исходную грибную суспензию, использованную для инаktivации. Животных заражали подкожно в объеме 0,5 мл материала (рис. 5).



Рис. 5. Заражение мышей подкожным методом при изучении полноты инактивации различных концентраций бета-ПРОПИОЛАКТОНа с грибной суспензией

За состоянием подопытных животных дважды в день вели клиническое наблюдение в течение всего опыта (7 суток).

Через 7 суток погибли все 3 мыши контрольной группы. Все остальные животные остались живы до конца опыта. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о инактивации гриба бета-ПРОПИОЛАКТОНа в концентрации 0,5 % при комнатной температуре. Исходя из полученных ранее данных и на основании опытов, проведенных на мышах, концентрация 0,5%-ного бета-ПРОПИОЛАКТОНа является наиболее оптимальной. Полученные данные позволили приступить к получению экспериментальной серии инактивированной вакцины против лимфангоита лошадей.

4. Заключение.

В результате проведенных экспериментов по подбору эффективных инактиван-

тов решили остановить свой выбор на глютексе, анолите и особенно на бета-ПРОПИОЛАКТОНе. Выбор 98% бета-ПРОПИОЛАКТОНа в качестве инактиванта для штаммов *Histoplasma farciminosum* обоснован тем, что в ряде зарубежных литературных источниках, а также согласно нашим данным бетапропилактон обладает способностью полного лишения инфекционности гриба при максимальном сохранении антигенных свойств.

Исходя из полученных ранее данных и на основании опытов, проведенных на мышах, концентрация 0,5%-ного бета-ПРОПИОЛАКТОНа 600 мин. является наиболее оптимальной. Полученные данные позволили приступить к получению экспериментальной серии инактивированной вакцины против лимфангоита лошадей.

Библиографический список

1. 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5121390/>
2. 2019. https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/epizootic_lymphangitis.pdf
3. 2016. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jcm.00896-16>
4. 2018. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/
5. 2021. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.15084>
6. 2018. [https://www.idosi.org/gv/gv20\(2\)18/3.pdf](https://www.idosi.org/gv/gv20(2)18/3.pdf)
7. <https://www.verywellhealth.com/what-is-an-inactivated-vaccine-201081>
8. Жугунисов К.Д., Жунушов А.Т. Совершенствование режима инактивации вируса блутанга бета-пропиолактоном / К.Д. Жугунисов, А.Т. Жунушов // Известия НАН КР. – 2017. – №2. – С. 35-40.
9. <https://www.nature.com/articles/35047580>
10. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-procedures-inactivation-ebola.pdf>
11. <https://academic.oup.com/jid/article/222/9/1462/5892951>

INACTIVATION OF INFECTIVITY OF HISTOPLASMA FARCIMINOSUM FUNGUS

B.A. Yespembetov, *Head of Laboratory, Candidate of Veterinary Sciences*

N.N. Zinina, *Leading Researcher, Candidate of Veterinary Sciences*

Ye.B. Serikbay, *Senior Laboratory Assistant, Bachelor*

M.K. Sarmykova, *Research Scientist, Master of Veterinary Sciences*

K.K. Tileukhanov, *Senior Laboratory Assistant, Master of Biology*

L.S. Toitanova, *Senior Laboratory Assistant, Bachelor*

N.S. Syrym, *Senior Researcher, Candidate of Veterinary Sciences*

Research Institute for Biological Safety Problems

(Kazakhstan, Gvardeyskiy)

***Abstract.** This article presents the results of the selection of inactivants for a vaccine against equine lymphangitis. Various inactivants such as DEI (N,N-dimethylethylenediamine), beta-PROPIOLACTONE, formaldehyde, alcohol, glutax and anolyte were used to work out the parameters of inactivation of the *Histoplasma farciminosum* fungus. At the same time, the optimal final concentration of beta-PROPIOLACTONE inactivant 0.5%, the temperature of the reaction medium (22 ± 3.0) 0C, pH 7.4-7.6, the duration of inactivation 600 min. were also established.*

***Keywords:** lymphangitis, horses, inactivant, fungus, *histoplasma farciminosum*, inactivation, vaccine, strain.*