

УДК 636.09:616-097

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА

*Кукаева А., магистрант 2 курса
Жумалин А.Х., магистр сельскохозяйственных наук
Сыздыкова А.С., магистр технических наук
Казахский агротехнический исследовательский университет им.
С.Сейфуллина
г. Астана*

Бруцеллез – это опасное зоонозное заболевание, которое угрожает как здоровью животных, так и людей. В мире одна четверть крупного рогатого скота (КРС) инфицирована бруцеллезом, что создает серьезные риски для населения. Эпидемиологическая ситуация остается настораживающей особенно в сельских районах, где болезнь передается через контакт с животными и их продуктами. Своевременное выявление инфицированных животных является эффективным средством профилактики бруцеллеза и минимизации риска заболеваемости людей [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно регистрируется около 500 000 новых случаев заболевания. Наибольшее число случаев наблюдается не только в развивающихся странах, но и в странах с развитыми аграрными системами, таких как Турция, Египет и Мексика [2]. В Казахстане, где животноводство является важным сектором экономики, бруцеллез также остается актуальной проблемой. Статистика показывает, что несмотря на принятые меры по контролю заболевания, уровень заболеваемости среди скота остается высоким [3].

Классические серологические реакции, такие как роз Бенгал проба (РБП), реакция агглютинации в пробирках (РА), реакция связывания комплемента (РСК) и иммуноферментный анализ (ИФА), используемые для выявления серопозитивных продуктивных животных, имеют определенные ограничения и их результаты, не всегда коррелируют. Кроме того, существенным недостатком указанных тестов является склонность к возникновению перекрестных реакций с близкородственными бактериями *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella spp.* и *Escherichia coli* [4], что приводит к получению ложноположительных результатов из-за сходства антигенных эпитопов липополисахаридов (ЛПС) клеточной стенки.

В этой связи, неполисахаридные антигены, а именно рекомбинантные белки внешней мембраны (БВМ) рода *Brucella* представляют определенный интерес в совершенствовании серологических реакций [5]. Среди последних наиболее практичным и доступным тестом является реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).

Материалы и методы. Приготовление формализированных эритроцитов. Кровь у интактных баранов отбирали во флаконы со стеклянными бусами, перемешивали путем встряхивания в течение 15 минут. После дефибрирования ее разводили 1:1 забуференным физиологическим фосфатно-буферным раствором (ЗФР) с рН 6.4. К 100 мл разведенной крови быстро добавляли смесь, состоящую из 20 мл нейтрального формалина (37-38%) и 20 мл ЗФР с рН 7.2, помещали в термостат при температуре 37°C, постоянно перемешивая на магнитной мешалке в течение 2-х часов. После этого смесь центрифугировали со скоростью 1500 об/мин в течение 10 минут. Осевшие эритроциты 4-кратно отмывали и ресуспендировали в 400-500 мл ЗФР (рН 7.2). Эритроцитарную взвесь помещали в холодильник при температуре 4°C.

Через 48 часов надосадочную жидкость удаляли, а осадок отмывали ЗФР (рН 7.2). Полученный остаток разбавляли ЗФР с рН 6.4 и готовили 2,5% суспензию эритроцитов. Последние консервировали, добавляя по каплям нейтральный формалин при перемешивании до его 1%-ной концентрации. Затем суспензия эритроцитов отмывалась трехкратно ЗФР (рН 7,2) на центрифуге со скоростью 1500 об/мин по 10 минут с последующим смешиванием с танином в равных объемах. Далее, суспензию эритроцитов выдерживали 20-минут в водяной бане при температуре +37°C, после чего повторяли отмывку в указанном выше режиме центрифугирования. Надосадочную жидкость удаляли, заливали осадок ЗФР (рН 7,2) и производили отмывку эритроцитов ЗФР (рН 6,4). В завершении содержание эритроцитов в суспензии доводили до 2,5% и консервировали нейтральным формалином до его 1%-ной концентрации [6].

Сенсибилизация формализированных эритроцитов рекомбинантными белками. В работе использовали рекомбинантный белок БВМ31, полученные А.К. Булашевым с соавт. (2018) [7].

Рекомбинантный белок в концентрации 1000 мкг/мкл добавляли к формализированным эритроцитам в объеме 0,5 мл, а затем вносили 0,5 мл 0,018-0,02%-ного риванола. Смесь выдерживали на водяной бане при температуре 45°C в течение 120 минут, встряхивая эритроциты в течение минуты через каждые 30 мин. По истечении времени центрифугировали 3 раза при 1500 об/мин по 10 минут. После этого жидкость на поверхности удаляли и осадок разводили в ЗФР (рН 7,2). Приготовленный эритроцитарный диагностикум на основе рекомбинантного белка БВМ31 использовали для постановки РНГА.

Приготовление контрольных сывороток проводилось по методике А.В. Иванова и соавт. (2016) [6].

Сыворотки крови животных. В работе были использованы 86 проб сывороток крови КРС, содержащиеся в неблагополучных по бруцеллезу сельских населенных пунктах.

Образцы сыворотки крови (КРС) исследовали на бруцеллез с помощью РБП в соответствии с методикой, описанной в Межгосударственном стандарте (ГОСТ 34105-2017).

Постановка РБП. РБП (Антиген, Алматы, Казахстан) проводился согласно инструкции производителя.

Метод постановки РНГА. В экспериментах использовали полистироловые 96-луночные микропланшеты для иммунологических реакций с U-образным (круглым) дном для ИФА (АРТАСА, Италия). В 12 лунок ряда микропланшета с помощью дозатора вносили по 50 мкл ЗФР. В первую лунку добавляли 50 мкл исследуемой сыворотки, а затем делали последовательные двукратные разведения путем переноса 50 мкл разведенной сыворотки из одной лунки в другую. Из 11 лунки 50 мкл жидкости удаляли, а 12 лунку использовали для контроля эритроцитарного диагностикума. Таким образом, получали разведения исследуемой сыворотки от 1:2 до 1:4096. Затем во все лунки ряда добавляли по 25 мкл (1 капля) 5%-ную суспензию эритроцитов, сенсibilизированных рекомбинантным белком. Содержимое лунок осторожно перемешивали покачиванием планшета и оставляли при температуре 37°C в течение 1–2 ч на неподвижной поверхности. Окончательный учет проводили через 24 часа [8].

Результаты и обсуждение

В таблице 1 приведены результаты исследований сывороток крови КРС, взятые в неблагополучных по бруцеллезу населенных пунктов, в РБП.

Таблица 1 – Результаты исследования сывороток крови животных в РБП

| Количество исследованных сывороток крови | Разведения сывороток крови | | | | | | | | | | |
|--|---|------|------|------|------|-----|------|-----|------|----|--|
| | нативная сыворотка | | 1:2 | | 1:4 | | 1:8 | | 1:16 | | |
| 86 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | |
| | Количество животных с (+) и (-) результатами, голов | | | | | | | | | | |
| | 32 | 54 | 14 | 72 | 11 | 75 | 6 | 80 | 4 | 82 | |
| | Количество животных с (+) и (-) результатами, % | | | | | | | | | | |
| 37,2 | 62,8 | 16,3 | 83,7 | 12,8 | 87,2 | 7,0 | 93,0 | 4,6 | 95,4 | | |
| Примечание: (+) - положительный результат; (-) - отрицательный результат | | | | | | | | | | | |

Как видно из табл.1, агглютинины в РБП были обнаружены в нативной сыворотке у 32, или 37,2%, животных, содержащихся в неблагополучных пунктах по бруцеллезу. Из них 10 голов (11,6%) показали положительный результат и в титрах 1:8-1:16. Явление «прозоны» не отмечалось.

В дальнейших исследованиях эти же образцы сывороток крови были протестированы в РНГА с использованием приготовленного эритроцитарного диагностикума на основе рекомбинантного белка (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты сравнительного исследования сывороток крови КРС в РНГА и РБП на бруцеллез

| Номера неблагополучных по бруцеллезу населенных пунктов | Количество животных, подвергнутых к исследованию | РНГА | | РБП | | Животные, показавшие (+) только по РНГА |
|--|--|------|------|------|------|---|
| | | (+) | (-) | (+) | (-) | |
| Первый | 32 | 15 | 17 | 11 | 21 | 4 |
| Второй | 54 | 26 | 28 | 21 | 33 | 5 |
| Общее количество исследованных животных, гол. / % | 86 | 41 | 45 | 32 | 54 | 9 |
| | | 47,7 | 52,3 | 37,2 | 62,8 | 10,5 |
| Примечание: (+) - положительный результат; (-) - отрицательный результат | | | | | | |

Из таблицы 2 следует, РНГА выявляла больше животных с положительными результатами на бруцеллез, нежели РБП, как среди поголовья первого (15 гол. против 11 гол.), так и второго неблагополучных по бруцеллезу населенных пунктов (26 гол. против 21 гол.). В целом, эритроцитарный диагностикум на основе рекомбинантного белка, РНГА позволил обнаружить *Brucella*-специфичные антитела у 10,5% животных, показавших отрицательные результаты на бруцеллез по данным РБП.

Таким образом, рекомбинантный белок БВМ31, использованный для приготовления эритроцитарного диагностикума, имеет перспективу быть использованными в разработке РНГА теста, отличающегося от РБП более высокой чувствительностью при исследовании КРС на бруцеллез.

Рекомбинантный белок БВМ31 может быть использован в качестве сенситина для приготовления эритроцитарного диагностикума, придающего РНГА более высокую чувствительность по сравнению с РБП. Тем не менее, необходимо вести дальнейшие исследования с целью определения специфичности РНГА на основе рекомбинантных белков с применением

антисывороток против патогенов, имеющих сходные антигенные детерминанты с бруцеллами.

Список литературы

- 1 Moriyón, I., Blasco, JM, Letesson, JJ, De Massis, F., Moreno, E. (2023). Brucellosis and one health: inherited and future challenges *Microorganisms*. 11(8). 2070. DOI:10.3390/microorganisms11082070
- 2 Сармурзина, ЗС, Аскарлов, АМ, Бекшин, ЖМ, Кундашев, КУ, Бисенова, ГН, Темирханов, АЖ. (2024). Бруцеллез-анализ по эпидемиологической и эпизоотологической ситуации в мире и Республике Казахстан. *Микробиология және вирусология*, 3(46), 9-31.
- 3 Beauvais, W., Coker, R., Nurtazina, G., Guitian J., Beauvais W. (2017). Policies and livestock systems driving brucellosis re-emergence in Kazakhstan. *Ecohealth.*, 14(2), 399-407. DOI: 10.1007/s10393-015-1030-7
- 4 Smirnova, EA, Vasin, AV, Sandybaev, NT. et al. (2013). Current methods of human and animal brucellosis diagnostics. *Adv Infect Dis.*, 3, 177-184.
- 5 Булашев, АК, Акибеков, ОС, Сураншиев, ЖА, Сыздыкова, АС, Іңірбай, БҚ. (2019). Использование белковых антигенов в серодиагностике Бруцеллеза крупного рогатого скота. *Вестник КазАТУ им. С. Сейфуллина*, 2(101), 92-101.
- 6 Иванов, АВ, Макаев, ХН, Мельникова, ЛА, Барбарова, ЛА, Муртазина ГХ, Иванова, СВ, Хисамутдинов, АГ. (2016). Способ получения эритроцитарного сибирезвенного антигена, способ получения контрольной положительной сыворотки для набора определения антител в сыворотке крови животных, вакцинированных против сибирской язвы, в реакции непрямой гемагглютинации и набор для определения антител. Патент № 2599035С1.
- 7 Bulashev, A., Jakubowski, T., Tursunov, K., Kiyan, V., Zhumalin, A. (2018). Immunogenicity and antigenicity of Brucella outer membrane proteins. *Veterinarija ir Zootechnika*, 76(98), 17-24.
- 8 Пушкарь, ВГ. (2023). Вариант постановки реакции непрямой гемагглютинации для цифрового учета результатов. *Известия высших учебных заведений*, 1(65), 38-48.