

Л.М.Михайлов, Н.Л.Баранникова, Л.Е.Токарева, Н.М.Андреевская, В.А.Михайлова, В.И.Кузнецов,  
К.Ю.Ястремская, С.В.Балахонov

## ПОЛУЧЕНИЕ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ БРУЦЕЛЛЕЗНОЙ ANTI-ABORTUS СЫВОРОТКИ НА ОСНОВЕ ТЕРМОЭКСТРАКТА ИЗ БРУЦЕЛЛ В S-ФОРМЕ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего востока», Иркутск,  
Российская Федерация

**Цель работы.** Получение кроличьей моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки к термоэкстракту из бруцелл в S-форме, оценка ее активности и специфичности. **Материалы и методы.** В работе использовали поливалентную гипериммунную бруцеллезную сыворотку, полученную к термоэкстракту, которую адсорбировали штаммом гетерологического вида *Brucella melitensis* 16M. Для оценки активности и специфичности полученной сыворотки использовали референтные, вакцинные и полевые штаммы бруцелл. **Результаты и выводы.** Полученная сыворотка обладала высокой активностью (титр 1:160, 1:320) и специфичностью, а результаты полностью совпадают с данными, указанными в таблице дифференциальных свойств, представленными в МУ 3.1.7.1189-03 «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей». Предложенный способ приготовления моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки позволяет значительно снизить биологическую опасность для персонала при проведении технологических операций.

**Ключевые слова:** бруцеллы, термоэкстракт, S-форма, моноспецифическая сыворотка.

Корреспондирующий автор: Михайлов Леонид Михайлович, e-mail: E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

L.M.Mikhailov, N.L.Barannikova, L.E.Tokareva, N.M.Andreevskaya, V.A.Mikhailova, V.I.Kuznetsov,  
K.Yu.Yastremskaya, S.V.Balakhonov

## Preparation of Monospecific Brucella Anti-Abortus Serum Based on Thermoextract From S-Form *Brucella*

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

**Objective** of the study is to prepare rabbit monospecific anti-abortus serum to a *Brucella* S-form thermoextract, as well as to evaluate its activity and specificity. **Materials and methods.** Utilized was polyvalent hyperimmune serum obtained to *Brucella* thermoextract. It was adsorbed by a strain of heterologous species *Brucella melitensis* 16 N. Reference, vaccinal and field *Brucella* strains were used to estimate the activity and specificity of the serum produced. **Results and conclusions.** This serum possesses high activity (1:160, 1:320 titer) and specificity, and the results completely coincide with the data specified in the table of differential properties presented in MR 3.1.7.1189-03 “Prophylaxis and laboratory diagnostics of human brucellosis». The outlined method for manufacturing monospecific *Brucella* anti-abortus serum permits for a considerable decrease in biological hazard for personnel involved in the technological operations.

**Key words:** *Brucella*, thermoextract, S-form, monospecific serum.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Leonid M. Mikhailov, e-mail: E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Mikhailov L.M., Barannikova N.L., Tokareva L.E., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Kuznetsov V.I., Yastremskaya K.Yu., Balakhonov S.V. Preparation of Monospecific Brucella Anti-Abortus Serum Based on Thermoextract From S-Form *Brucella*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:78–80. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-78-80

Моноспецифическая бруцеллезная сыворотка anti-abortus используется при дифференциации видов бруцелл [4]. Известно, что моноспецифическую бруцеллезную anti-abortus сыворотку готовят с использованием эталонного штамма ФАО/ВОЗ – *Brucella abortus* 544 или вакцинного – *B. abortus* 19VA, живыми культурами которых иммунизируют кроликов (внутривенно однократно суспензией клеток в разных концентрациях). Полученную антисыворотку адсорбируют штаммом *B. melitensis* 16M, *B. melitensis* 28 или *B. melitensis* 548. Титры специфических антител в полученных моноспецифических бруцеллезных anti-abortus сывороток при этом составляли 1:160–1:640 [1, 2]. Основным недостатком этих методов является использование для получения бруцеллезной антисыворотки живой культуры вирулентного штамма возбу-

дителя, что требует соблюдения на разных этапах работы специальных мер для обеспечения требований биобезопасности персонала. Все бруцеллы, в том числе и вакцинный штамм, который обладал остаточной вирулентностью, способны вызывать иммуноаллергические реакции. Поэтому поиск слабовирулентных штаммов или специфических бруцеллезных антигенов для получения высокотитражной антисыворотки, пригодной для получения после ее адсорбции моноспецифических сывороток, а также снижение биологической опасности при проведении технологических приемов работ являются актуальными.

Цель исследования – получение кроличьей моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки к термоэкстракту из бруцелл в S-форме, оценка ее активности и специфичности.

**Материалы и методы**

**Результаты и обсуждение**

Донорами гипериммунной сыворотки служили кролики породы шиншилла из лаборатории подопытных животных Иркутского научно-исследовательского противочумного института. Термоэкстракт готовили в соответствии с патентом [3].

Иммунизацию животных осуществляли по двухцикловой схеме, что позволило получить антисыворотку с высоким титром специфических антител 1:1600–1:3200. По отработанной ранее в лаборатории методике для получения моноспецифической anti-abortion сыворотки гипериммунную сыворотку адсорбировали штаммом гетерологичного вида *B. melitensis* 16М. Трехсуточную культуру штамма смывали ЗФР (рН 7,2±0,1) и добавляли до 2,5 % формалина, взвесь оставляли при (20±2) °С в течение 24 ч. Проводили контроль на специфическую стерильность. Бактериальную массу центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость сливали, и ЗФР (рН 7,2±0,1) доводили концентрацию бактериальной взвеси до 5·10<sup>11</sup> м.к./мл. Полученную бактериальную взвесь в количестве 0,25 мл однократно добавляли в 2,5 мл сыворотки и оставляли на два часа при 37 °С, помешивая через каждые 15 мин, после чего выдерживали 15 ч при (20±2) °С. Затем сыворотку центрифугировали при 6000 об./мин в течение 20 мин и удаляли осадок. После адсорбции проверяли титры специфических антител в объемной реакции агглютинации (РА).

В качестве контроля моноспецифической бруцеллезной anti-abortion сыворотки использовали референтные, вакцинные и полевые штаммы бруцелл из музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института и выделенные от людей.

Для поиска однократного оптимального количества адсорбента, приготовленного из *B. melitensis* 16М и добавляемого в 2,5 мл адсорбируемой бруцеллезной сыворотки для получения моноспецифической бруцеллезной anti-abortion сыворотки, испытали три серии сывороток и четыре дозы адсорбента.

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что полная адсорбция антисывороток во всех трех сериях получена при дозах адсорбента, составляющих от 0,15 до 0,25 мл. При дозе адсорбента 0,1 мл отмечены положительные реакции на один–два креста в разведении 1:20. Наибольшие титры специфических anti-abortion антител зарегистрированы при добавлении 0,15 мл адсорбента: серия 1 – 1:320, серия 2 – 1:640, серия 3 – 1:160. В наших, ранее проведенных опытах показано, что полное истощение бруцеллезной антисыворотки, полученной иммунизацией кроликов живыми клетками бруцелл вида *abortus*, адсорбентом из штамма *B. melitensis* 16М происходило при использовании дозы не менее 0,25 мл на 2,5 мл сыворотки. Поэтому следует отметить, что при получении бруцеллезной кроличьей сыворотки иммунизацией инактивированным антигеном – термоэкстрактом из *B. abortus* 544, для полной адсорбции требуется меньшее количество (0,15 мл) адсорбента, при этом моноспецифическая бруцеллезная anti-abortion сыворотка имеет высокую специфичность и активность.

Полученная моноспецифическая бруцеллезная anti-abortion сыворотка испытана с 11 штаммами бруцелл трех основных видов (*melitensis*, *abortus*, *suis*) и некоторых их биоваров, а также с 9 культурами, выделенными от больных бруцеллезом людей.

Таблица 1

**Активность моноспецифической бруцеллезной anti-abortion сыворотки после адсорбции гетерологичным штаммом *B. melitensis* 16М**

Сыворотка бруцеллезная кроличья (anti-abortion) серия, титр	Доза адсорбента <i>B. melitensis</i> 16М, мл	Активность моноспецифической бруцеллезной anti-abortion сыворотки в РА															
		<i>B. melitensis</i> 16М								<i>B. abortus</i> 544							
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	КС	КА	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	КС	КА
Серия 1, 1:1600	0,25	–	–	–	–	–	–	–	–	++++	++++	++++	++	+	–	–	–
	0,2	–	–	–	–	–	–	–	–	++++	++++	++++	+++	–	–	–	–
	0,15	–	–	–	–	–	–	–	–	++++	++++	++++	++++	+++	+	–	–
	0,1	++	+	–	–	–	–	–	–	++++	++++	++++	++++	+++	++	–	–
Серия 2, 1:1600	0,25	–	–	–	–	–	–	–	–	++++	++++	+	–	–	–	–	–
	0,2	–	–	–	–	–	–	–	–	++++	++++	+++	+++	++	+	–	–
	0,15	–	–	–	–	–	–	–	–	++++	++++	++++	+++	++	++	–	–
	0,1	+	–	–	–	–	–	–	–	++++	++++	+++	++	+	+	–	–
Серия 3, 1:1600	0,25	–	–	–	–	–	–	–	–	++	++	+	±	–	–	–	–
	0,2	–	–	–	–	–	–	–	–	++++	+++	++	++	+	+	–	–
	0,15	–	–	–	–	–	–	–	–	++++	+++	+++	++	+	+	–	–
	0,1	+	–	–	–	–	–	–	–	++++	+++	+++	++	+	+	–	–

Примечания: «++++», «+++», «++», «+», «±», «–» – выраженность реакции в крестах, «–» – результат отрицательный.

Таблица 2

**Специфичность моноспецифической бруцеллезной сыворотки anti-abortus в РА**

Наименование штамма	Биовар	Моноспецифическая бруцеллезная сыворотка anti-abortus	Контроль сыворотки	Контроль антигена
<i>B. melitensis</i> 16М*	1	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> REV-1*	Вакцина	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> Ether*	3	1:80	Отр.	Отр.
<i>B. abortus</i> 19 ВА*	Вакцина	1:160	Отр.	Отр.
<i>B. abortus</i> Tulya*	3	1:160	Отр.	Отр.
<i>B. abortus</i> 793*	3	1:160	Отр.	Отр.
<i>B. abortus</i> 86/8159*	2	1:160	Отр.	Отр.
<i>B. abortus</i> 292*	4	1:160	Отр.	Отр.
<i>B. suis</i> 1330*	1	1:80	Отр.	Отр.
<i>B. suis</i> 686*	3	1:80	Отр.	Отр.
<i>B. suis</i> (rangiferi) 181*	4	1:80	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> 239**	1	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> 240**	1	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> 241**	1	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> 9**	1	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> 17**	1	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> 19**	1	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> 33**	1	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> 34**	1	Отр.	Отр.	Отр.
<i>B. melitensis</i> 349**	3	1:80	Отр.	Отр.

\*Штаммы из музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института; \*\*Штаммы, выделенные от людей.

Примечание: Отр. – реакция отрицательная.

Полученные при испытании результаты, представленные в табл. 2, говорят о том, что моноспецифическая бруцеллезная anti-abortus сыворотка взаимодействовала с бруцеллами в соответствии с требованиями МУ 3.1.7.1189-03 «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» и полностью совпадают с данными, указанными в таблице, отражающей дифференциальные свойства, определяемые этим методом.

Таким образом, получение моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки путем адсорбции антисыворотки, приготовленной с использованием для иммунизации кроликов инактивированного

термоэкстракта из бруцелл в S-форме, позволяет значительно снизить биологическую опасность для персонала при проведении технологических операций.

Моноспецифическая бруцеллезная anti-abortus сыворотка, полученная по предлагаемой методике, обладает высокой специфичностью и активностью и может быть использована для внутривидовой дифференциации бруцелл.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вилинская С.В., Лямкин Г.И., Ляпустина Л.В., Русанова Д.В. Способ получения бруцеллезной моноспецифической сыворотки anti-abortus. Патент РФ 2375074, опубл. 10.12.2009. Бюл. № 34.

2. Дальвадянт В.Г., Лямкин Г.И., Ляпустина Л.В., Таран И.Ф., Луканина Л.М. Способ получения моноспецифических сывороток для дифференциации возбудителя бруцеллеза. Патент РФ 2104031, опубл. 10.02.1998.

3. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Баранникова Н.Л., Балахонов С.В., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Козулина К.Ю., Шестопалов М.Ю., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Татарникова О.Г., Кузнецов В.И. Способ получения антигенного препарата из бруцелл в L-форме. Патент РФ 2416429, опубл. 20.04.2011. Бюл. № 11.

4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

#### References

1. Vilinskaya S.V., Lyamkin G.I., Lyapustina L.V., Rusanova D.V. [Method for the production of brucellosis monospecific anti-abortus serum]. RF Patent 2375074, 10.12.2009.

2. Dal'vadyants V.G., Lyamkin G.I., Lyapustina L.V., Taran I.F., Lukanina L.M. [Method for the production of monospecific sera for differentiation of brucellosis agent]. RF Patent 2104031, 10.02.1998.

3. Mikhailov L.M., Kalinovskiy A.I., Barannikova N.L., Balakhonov S.V., Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Kozulina K.Yu., Shestopalov M.Yu., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Tatarnikova O.G., Kuznetsov V.I. [Method for the production of antigen preparation from L-form brucella]. RF Patent 2416429, 20.04.2011.

4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. 2<sup>nd</sup> Edition, revised and enlarged. M.: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.

#### Authors:

Mikhailov L.M., Barannikova N.L., Tokareva L.E., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Kuznetsov V.I., Yastremskaya K.Yu., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

#### Об авторах:

Михайлов Л.М., Баранникова Н.Л., Токарева Л.Е., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Кузнецов В.И., Ястремская К.Ю., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Поступила 19.07.16.