

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

ПОЛУЧЕНИЕ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК К ТЕРМОЭКСТРАКТАМ ИЗ БРУЦЕЛЛ В S- И L-ФОРМАХ

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

Цель. Получение гипериммунных сывороток к термоэкстрактам из бруцелл в S- и L-формах. **Материалы и методы.** В работе использовали термоэкстракты, полученные из штамма *Brucella abortus* И-206 в S- и L-формах. В качестве животных-продуцентов сывороток использовали кроликов породы Шиншилла. Специфическую активность определяли в пробирочной реакции агглютинации с диагностическими: корпускулярным экспериментальным из бруцелл в L-форме и коммерческим бруцеллезным цветным, специфичность – с гетерологичными штаммами: *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Vibrio cholerae* 5 (Огава), *V. cholerae* 35 А3 (Инаба), *Yersinia enterocolitica* O:9, *Y. pestis* EV НИИЭГ, *Escherichia coli* 3912/41. Содержание белка в полученном экстракте определяли по методу Лоури. **Результаты и выводы.** В результате проведенных исследований показана антигенная активность термоэкстрактов, разработаны схемы иммунизации, позволяющие получать высокоактивные и специфичные сыворотки, которые могут быть использованы для идентификации и дифференциации возбудителя бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллы, термоэкстракты, S- и L-формы, сыворотки

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

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

Preparation of Hyperimmune Sera to Thermoextracts of Brucella S- and L-Forms

Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation

Objective of the study was to prepare hyperimmune sera to *Brucella* S- and L-form thermo-extracts. **Materials and methods.** Thermo-extracts from *Brucella abortus* I-206 strain in S- and L-forms were used. Chinchilla rabbits were used as animals, sera producers. Specific activity was determined by test-tube agglutination with *Brucella* L-form corpuscular experimental and commercial *Brucella* colored diagnosticums, while specificity – with heterologous strains: *Francisella tularensis* 15 NIEG, *Vibrio cholerae* 5 (Ogawa), *V. cholerae* 35 A3 (Inaba), *Yersinia enterocolitica* O:9, *Y. pestis* EV NIEG, *Escherichia coli* 3912/41. Protein content in the obtained extract was defined using Lowry method. **Results and conclusions.** Consequently, the antigen activity of the generated thermo-extracts has been shown, the immunization schemes have been developed permitting to obtain highly active and specific sera that could be used for identification and differentiation of brucellosis causative agent.

Key words: *Brucella*, thermo-extract, S- and L-form, sera.

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

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

Citation: Mikhailov L.M., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Barannikova N.L., Tokareva L.E., Yastremskaya K.Yu., Balakhonov S.V. Preparation of Hyperimmune Sera to Thermoextracts of Brucella S- and L-Forms. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:98–101. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-98-101

В лабораторной диагностике бруцеллеза для идентификации и дифференциации возбудителя применяют бруцеллезные поли- и моноспецифические сыворотки [4], для получения которых используют корпускулярные и растворимые антигены бруцелл вирулентных и вакцинных штаммов [5]. Известно, что иммунодоминантным антигеном бруцелл является липополисахарид, содержащийся в клеточной стенке [10, 11], который не обладает строгой специфичностью, так как содержит антигенные детерминанты, общие с другими микроорганизмами: *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* (серовара O:9), *Vibrio cholerae* [9]. В процессе L-трансформации бруцеллы утрачивают клеточную стенку, сохраняя при этом антигенность, то есть способность вызывать анти-телообразование при введении их в макроорганизм

[2]. Термоэкстракт (ТЭ), выделенный из бруцелл в L-форме, обладает высокой антигенной активностью и специфичностью [3]. В связи с этим актуальными остаются вопросы, связанные с возможностью использования термоэкстрактов для получения бруцеллезных антисывороток.

Цель исследования – получение гипериммунных сывороток к термоэкстрактам из бруцелл в S- и L- формах.

Материалы и методы

В работе использовали S- и L-ТЭ из штамма *B. abortus* И-206. Для этого штамм *B. abortus* И-206 в S- и L-формах выращивали на печеночном агаре в термостате при температуре (37±1) °С. Культуры

смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР), рН 7,2±0,1. Бактериальные суспензии инактивировали добавлением формалина до конечной концентрации 2,5 % и выдерживали в течение 24 ч в термостате при температуре (37±1) °С, затем проводили контроль специфической стерильности. Концентрацию бруцелл доводили ЗФР (рН 7,2±0,1) по отраслевому стандартному образцу мутности 10 МЕ ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-соответствующего года выпуска) до 5·10¹⁰ м.к./мл. Взвеси дополнительно прогревали на водяной бане при температуре 100 °С в течение 45 мин и центрифугировали при 7000 об/мин в течение 50 мин. Полученные ТЭ декантировали. В качестве животных-продуцентов использовали кроликов породы Шиншилла массой 2,5–3 кг.

Специфическую активность полученных сывороток определяли в пробирочной реакции агглютинации (РА) с диагностикумами: экспериментальным корпускулярным из бруцелл в L-форме и коммерческим бруцеллезным цветным (серия 4, 10) в соответствии с методическими указаниями МУ 3.1.7.1189-03. «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей. Профилактика инфекционных болезней. Инфекции общие для человека и животных.», специфичность – с гетерологичными штаммами: *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *V. cholerae* 5 (Огава), *V. cholerae* 35 АЗ (Инаба), *Y. enterocolitica* 383 (серовара О:9), *Y. enterocolitica* 628/1 (серовара О:3), *Escherichia coli* 3912/41, *Y. pestis* EV НИИЭГ, а также *B. ovis* 63/290 в R-форме.

В качестве контроля использовали коммерческую поливалентную бруцеллезную сыворотку (серия 3) (ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт») и экспериментальную кроличью сыворотку, полученную нами против бруцелл в L-форме [2]. Сыворотки консервировали добавлением борной кислоты до 2 %.

Содержание белка в полученных экстрактах определяли по методу О.Н. Lowry [12] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина. Суммарное количество нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически по методу А.С. Спирина [6]. Определение общего содержания углеводов осуществляли в реакции с фенолом и концентрированной серной кислотой согласно методике Р. Хансон и Дж. Филлипс с использованием глюкозы в качестве стандарта [7]. Содержание 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) – в реакции с тиобарбитуровой кислотой после гидролиза в 0,02 N растворе H₂SO₄ в течение 20 мин при 100 °С [7].

Результаты и обсуждение

Результаты изучения химического состава полученных S- и L-ТЭ представлены в табл. 1, из которой следует, что в процессе L-трансформации изменяется количественный показатель содержания белка. В L-ТЭ содержание белка выше в 2,8 раза, чем в S-ТЭ,

а уровень углеводов возрастает незначительно. По содержанию нуклеиновых кислот в L-ТЭ превышение составляет в четыре раза, а КДО – наоборот, в L-ТЭ ниже в три раза, чем в S-ТЭ. Это свидетельствует о том, что в процессе L-трансформации изменяется химический состав бруцелл.

Для получения гипериммунной сыворотки к S-ТЭ кроликам перед иммунизацией вводили в подушечки задних лап по 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Через 7–10 сут кроликов иммунизировали в подколенные лимфатические узлы задних лап S-ТЭ в количестве 135 мкг (расчет по белку), растворенным в 0,5 мл ЗФР (рН 7,2±0,1), и одновременно внутримышечно 68 мкг S-ТЭ в 0,5 мл ЗФР с 0,5 мл ПАФ (смесь). На 4-е сутки кроликам вводили в подушечки передних лап и внутримышечно по 135 мкг в 1 мл смеси. Через 7 дней после последней инъекции антигена брали пробу крови и в сыворотке определяли титр специфических антител.

Через 15 сут проводили второй цикл иммунизации комплексом антиген-антитело (АГ-АТ). Для этого у животных забирали кровь в количестве 8–10 мл, необходимым для получения 3–5 мл сыворотки. Сыворотку разливали по 1,0 мл в 3 стерильные пробирки и в каждую вносили S-ТЭ в дозах 203, 270, 338 мкг соответственно. Комплекс АГ-АТ вводили внутривенно трехкратно с интервалом между инъекциями 5 дней кролику, от которого получена сыворотка. Одновременно каждому животному внутримышечно вводили по 203 мкг АГ в 1 мл смеси. Через 7–9 сут после последней инъекции комплексом АГ-АТ проводили тотальное кровопускание кроликов и получали сыворотки.

Для получения гипериммунной сыворотки к L-ТЭ кроликам перед иммунизацией вводили в подушечки задних лап по 0,5 мл ПАФ, одновременно внутримышечно – 460 мкг (расчет по белку). Через 5–7 сут кроликов иммунизировали L-ТЭ в количестве 460 мкг, растворенного в 1 мл смеси, в подколенные лимфатические узлы задних лап и одновременно внутримышечно – 820 мкг в 1 мл смеси. На 4-е сутки вводили в подушечки задних лап 325 мкг и внутримышечно – 820 мкг в 1 мл смеси. Через 7 дней после последней инъекции антигена брали пробу крови и в сыворотке определяли титр специфиче-

Таблица 1

Химический состав термоэкстрактов из *B. abortus* И-206 в S- и L-формах

Показатели	S-ТЭ из <i>B. abortus</i> в S-форме		L-ТЭ из <i>B. abortus</i> в L-форме	
	мкг/мл	%*	мкг/мл	%*
Белок	166,7±36,5	16,7±3,6	462,6±30,5	46,2±3
Углеводы	112,7±6,9	11,2±0,7	148,0±24,7	14,8±2,5
Нуклеиновые кислоты	4,8±0,19	0,5±0,02	13,2±3,39	1,32±0,34
2-кето-3-дезоксиктоновая кислота	4,8±0,6	0,5±0,06	1,8±0,44	0,2±0,04

*Средняя арифметическая из 5 определений и ее средняя ошибка.

Таблица 2

Активность и специфичность кроличьей сыворотки, полученной к S-ТЭ

Антигены	Кроличья сыворотка, полученная к S-ТЭ	Диагностическая поливалентная бруцеллезная сухая сыворотка, серия 3 (контроль)
Диагностикум бруцеллезный цветной для РА (серия 4-10)	1:3200	1:1600
<i>E. coli</i> 3912/41	-	-
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	-	-
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	-	1:80
<i>V. cholerae</i> 5 (Огава)	-	1:40
<i>V. cholerae</i> 35 А3 (Инаба)	-	1:40
<i>Y. enterocolitica</i> 628/1 (серовара О:3)	-	-
<i>B. ovis</i> 63/290 (R-форма)	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> 383 (серовара О:9)	1:1600	1:1600

ских антител.

Через 15 сут проводили второй цикл иммунизации комплексом АГ-АТ. Сыворотку разливали по 1,0 мл в 3 стерильные пробирки и в каждую вносили 690 мкг АГ. Комплекс АГ-АТ вводили внутривенно трехкратно кролику, от которого получена сыворотка, с интервалом между инъекциями 5 дней. Одновременно каждому животному вводили по 460 мкг антигена внутримышечно в 1 мл смеси. Через 7–9 сут после последней инъекции комплексом АГ-АТ проводили тотальное кровопускание кроликов и получали сыворотки.

Активность и специфичность бруцеллезной сыворотки, полученной к S-ТЭ, определяли в сравнении с коммерческой поливалентной бруцеллезной сывороткой (табл. 2) в пробирочной РА. Как видно из табл. 2, кроличья сыворотка, полученная к S-ТЭ, по активности практически не отличалась от коммерческой поливалентной бруцеллезной сыворотки, но была более специфична. Кроличья сыворотка к S-ТЭ не реагировала с гетерологичными штаммами, тогда как поливалентная бруцеллезная сыворотка взаимодействовала с вышеуказанными штаммами в пределах 1/10 титра, что соответствует техническим условиям на сыворотку. С *Y. enterocolitica* 383 (серовара О:9) обе сыворотки реагировали.

Активность и специфичность бруцеллезной сыворотки к L-ТЭ определяли в сравнении с экспериментальной кроличьей сывороткой, полученной против бруцелл в L-форме (табл. 3). Результаты табл. 3 свидетельствуют о том, что сыворотка, полученная против бруцелл в L-форме, высокоактивна (1:3200) и достаточно специфична (реагирует с *Y. enterocolitica* 628/1 серовара О:3 в титре 1:20). Сыворотка, полученная на L-ТЭ, обладает довольно высокой активностью (1:800) и высокой специфичностью (нет перекрестных реакций с гетерологичными штаммами), которую также можно использовать для идентификации бруцелл в L-форме.

Таким образом, кроличья сыворотка, получен-

Таблица 3

Активность и специфичность экспериментальных кроличьих сывороток, полученных на L-ТЭ и против бруцелл в L-форме в РА

Антигены	Кроличья сыворотка, полученная на L-ТЭ	Экспериментальная сыворотка, полученная против бруцелл в L-форме
Антиген корпускулярный <i>B. abortus</i> И-206 в L-форме	1:800	1:3200
<i>E. coli</i> 3912/41	-	-
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	-	-
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	-	-
<i>V. cholerae</i> 5 (Огава)	-	-
<i>V. cholerae</i> 35 А3 (Инаба)	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> 628/1 (серовара О:3)	-	1:20
<i>B. ovis</i> 63/290 (R-форма)	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> 383 (серовара О:9)	-	-

ная к S-ТЭ, обладает более высокой активностью и специфичностью (не реагирует с гетерологичными штаммами микроорганизмов, кроме *Y. enterocolitica* 383 (серовара О:9) по сравнению с поливалентной бруцеллезной сывороткой. Кроличья сыворотка, полученная на L-ТЭ, активна (титр 1:800) и высоко-специфична (не взаимодействует с гетерологичными штаммами микроорганизмов).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Репина Л.П. Способ получения диагностической агглютинирующей сыворотки против бруцелл в L-форме. Патент РФ 2242765, опубл. 20.12.2004. Бюл. 35.
2. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю., Татарникова О.Г., Репина Л.П., Болдина А.А., Капустин Ю.М. Антисыворотки к бруцеллам в L-форме. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2004; 1(2):143–6.
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. Изд. 2-е. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Саяпина Л.В., Комратов А.В., Храмов М.В., Торочин М.И., Фадейкина О.В., Волкова Р.А., Русанова Д.В., Немировская Т.И., Лямкин Г.И. Аттестация отраслевого стандартного образца сыворотки бруцеллезной диагностической поливалентной для реакции агглютинации. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2014; 4(52):42–7.
6. Спиринов А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. Биохимия. 1958; 23(5):656–62.
7. Хансон Р. Химический состав бактериальной клетки. В кн.: Методы общей бактериологии. Кн. 2. М.; 1984. С. 283–373.
8. Berman D.T., Kurtz R.S. Relationship of biological activities to structures of *Brucella abortus* endotoxin and LPS. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 1987; 138(1):98–101.
9. Chenais, E. Bagge, E. Lambert, S.T. Artursson, K. *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for *Brucella melitensis*. Infect. Ecol. Epidemiol. 2012; 2:19027. DOI:10.3402/iee.v2i0.19027.
10. Kubler-Kielb J., Vinogradov E. Reinvestigation of the structure of *Brucella* O-antigens. Carbohydr. Res. 2013; 378:144–7.
11. Kubler-Kielb J., Vinogradov E. The study of the core part and non-repeating elements of the O-antigen of *Brucella* lipopoly-

saccharide. *Carbohydr. Res.* 2013; 366:33–7.

12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

References

1. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Repina L.P. [Method for the production of diagnostic agglutinating serum against *Brucella* L-form]. RF Patent No 2242765, 20.12.2004.

2. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Balakhonov S.V., Shestopalov M.Yu., Tatarnikova O.G., Repina L.P., Boldina A.A., Kapustin Yu.M. [Anti-sera to *Brucella* L-form]. *Bulletin of the East-Siberian Scientific Center, RAMS Siberian Branch.* 2004; 1(2):143–6.

3. Mikhailov L.M., Kalinovsky 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 *Brucella* L-form]. RF Patent No 2416429, 20.04. 2011.

4. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. 2nd Edition, M.: CJSC “Shiko”, 2013. 560 p.

5. Sayapina L.V., Komratov A.V., Khramov M.V., Toropchin M.I., Fadeykina O.V., Volkova R.A., Rusanova D.V., Nemirovskaya T.I., Lyamkina G.I. [Certification of the departmental standard specimen of diagnostic polyvalent *Brucella* serum for agglutination assay]. *Biopreparaty. Profilakt. Diagnost. Lechenie.* 2014; 4(52):42–7.

6. Spirin A.S. [Spectrophotometric evaluation of the aggregate nucleic acid amount]. *Biokhimiya.* 1958; 23(5): 656–62.

7. Hanson R. [Chemical composition of bacterial cell]. In: [Methods of General Bacteriology]. Vol. 2. M.; 1984. P. 283–373.

8. Berman D.T., Kurtz R.S. Relationship of biological activities to structures of *Brucella abortus* endotoxin and LPS. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1987; 138(1):98–101.

9. Chenais, E. Bagge, E. Lambertz, S.T. Artursson, K. *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for *Brucella melitensis*. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2012; 2:19027. DOI:10.3402/iee.v2i0.19027.

10. Kubler-Kielb J., Vinogradov E. Reinvestigation of the structure of *Brucella* O-antigens. *Carbohydr. Res.* 2013; 378:144–7.

11. Kubler-Kielb J., Vinogradov E. The study of the core part and non-repeating elements of the O-antigen of *Brucella* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 2013; 366:33–7.

12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

Authors:

Mikhailov L.M., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Barannikova N.L., Tokareva L.E., 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. Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Баранникова Н.Л., Токарева Е.Л., Ястремская К.Ю., Балахонov 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 07.04.16.