

УДК: 619:616.981.42

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ НАБОРОВ ИФА ДЛЯ  
ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЁЗА ЖИВОТНЫХ****Саидов А.А.<sup>1</sup>, Рузимуродов М.А.<sup>1</sup>, Абдалимов С.Х.<sup>1</sup>, Каюмов Э.А.<sup>2</sup>**Научно-исследовательский институт ветеринарии,  
СП ООО «UNIGEN».**Аннотация**

В статье приведены материалы по испытанию отечественного набора ИФА-«Бруцеллез IgG-ИФА» предназначенного для диагностики бруцеллёза животных. Результаты предварительных исследований указывают на высокую их специфичность и активность по сравнению с традиционным классическим методом РА предназначенного для скрининговой диагностики.

**Ключевые слова:** Бруцеллез, антиген, антитела, иммуноферментный анализ, конъюгат, стоп-реагент.

**Введение.** Бруцеллез - особо опасное зоонозное заболевание, склонную к переходу в хроническую форму и широко распространенное среди животных и людей. С момента открытия возбудителя прошло уже более 135 лет. Однако, несмотря на то, что это заболевание хорошо изучено многими отечественными и зарубежными исследователями, проблема бруцеллеза остается актуальной и по сей день во многих странах мира. В экономически развитых странах, таких как США, Франция, Германия, Дания, Норвегия, Швеция, Финляндия, Швейцария и др. достигнуты определенные успехи в борьбе с бруцеллезом крупного рогатого скота, вызванной видом *Brucella abortus*. Иначе обстоит дело с бруцеллезом мелкого рогатого скота, вызываемого видом *Brucella melitensis*, эпизоотическая и эпидемическая ситуация по которым ухудшается. Так, в южной полосе Европы и примыкающих к бассейну Средиземноморья (Юго-восточная Франция, Португалия, Испания, Греция, Италия, Турция, Сицилия, Мальта, Крит и др.) эпидемический бруцеллез достаточно широко распространен среди людей и связано это в первую очередь с поражённостью бруцеллёзом коз и овец и широким употреблением молочной продукции в частности сыров и брынзы [1, 2, 3, 4, 5].

В странах СНГ: России, Азербайджане, Казахстане, Киргизии, Таджикистане, Узбекистане, Армении, Грузии, Туркмении и др., заболевание бруцеллез, также является одной из наиболее актуальных проблем.

В частности, в настоящее время эпизоотическая и эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Узбекистане остается не совсем благоприятной и

определяется наличием бруцеллеза в основном среди мелкого и крупного рогатого скота.

Сегодня поголовье скота в Узбекистане насчитывает более 12 млн. голов крупного и примерно - 25 млн. голов мелкого рогатого скота. Одной из основных причин наличия бруцеллёза в стране заключается в том, что 94,1% крупного и 83,9% мелкого рогатого скота находится в частных подворьях дехканских хозяйств, где проведение противобруцеллёзных мероприятий и контроль за ним становится очень трудоёмким и затратным. Другой немаловажной причиной является то, что не изученными остаются вопросы эпизоотологии бруцеллёза лошадей, свиней, верблюдов и др. видов животных, которые также могут служить источником данной инфекции и их роль в распространении бруцеллёза имеет существенное значение.

Известно, что первостепенными, в борьбе с бруцеллёзом являются контроль и специфическая профилактика. Задачей контроля и специфической профилактики бруцеллёза является искусственное снижение степени заболеваемости животных до относительно низкого уровня при его возникновении или распространении внутри указанного района. А это решение социальных и экономических вопросов, т.е. исключение его влияния на здоровье людей и торговлю животноводческой продукцией.

Для проведения своевременного контроля необходимо наличие компетентных лабораторий, специалистов и достаточного количества в первую очередь диагностических средств.

Поэтому одной из основных задач, стоящих перед ветеринарной наукой и исследователями, является разработка и внедрение новых инновационных биотехнологических приёмов, направленных на производство высокоэффективных диагностикумов. Одним из эффективных и достоверных методов при диагностики инфекционных болезней является иммуноферментный анализ (ELISA).

Целью наших научных исследований являлось испытание впервые разработанных в Узбекистане отечественных наборов, предназначенных для иммуноферментного анализа и используемых для диагностики бруцеллёза животных.

### **Материалы и методы**

Разработка реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА) - «Набор реагентов для иммуноферментного выявления IgG антител к возбудителю бруцеллеза в сыворотке (плазме) крови крупного рогатого скота» (далее «Бруцеллез IgG-ИФА») проводилась совместно со специалистами СП ООО «UNIGEN» и Российской компанией «ХЕМА» на базе Научно-исследовательского института ветеринарии.

При изготовлении наборов «Бруцеллез IgG-ИФА» использовали планшеты - 96-луночные полистироловые, стрипированные (или моноплитки), с сорбированным антигеном. В качестве отрицательного контроля, использовали сыворотку крови КРС, не содержащих антител к возбудителю бруцеллеза. Положительными контролями, служили сыворотки крови КРС, с известным содержанием IgG антител к возбудителю бруцеллеза. Также, использовали готовое к применению конъюгаты антител, конъюгированные пероксидазой хрена с красителем и субстратным раствором тетраметилбензидина (ТМБ) (произведенными компанией «ХЕМА»).

Для производственного изготовления раствора Буфера для разведения образцов, в деионизированной воде растворяли следующие реагенты: натрий хлористый (NaCl), натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), натрий фосфорнокислый двузамещенный 2-водный ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), Твин-20 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ ), краситель.

26-кратный концентрат отмывочного раствора изготавливали путем растворения в деионизированной воде следующих реагентов: натрия хлористого (NaCl), Твина-20 ( $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ ), кислоты бензойной ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$ ).

Для тщательного и быстрого растворения использовали мешалки с подогревом. После приготовления во всех растворах стабилизировали уровень pH и стерилизовали путем мембранной фильтрацией.

Для приготовления стоп-реагента, использовали 5% раствор серной кислоты.

Изготовленные готовые растворы при постоянном тщательном перемешивании расфасовывали во флаконы из полипропилена, плотно закрывали завинчивающимися крышками.

Качество всех изготовленных реагентов контролировали путем изучения физических, химических, серологических и других свойств на основе классических физико-химических и серологических методов.

Для испытания отечественных наборов для ИФА использовали сыворотки крови, полученные из хозяйств с различной эпизоотической ситуацией по бруцеллёзу. При проведении реакции использовали следующее оборудование: фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм; термостат, поддерживающий температуру  $+37 \pm 2^\circ\text{C}$ ; вошер (промыватель) для планшет; дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие дозировать объемы в диапазоне 10–250 мкл; шейкер для планшетов; цилиндр мерный вместимостью 1000 мл.

Определение IgG антител к антигенам возбудителя бруцеллёза крупного рогатого скота (КРС) проводили в непрямом варианте иммуноферментного анализа. Набор «Бруцеллез IgG-ИФА» рассчитан на проведение анализа в

монопликатах 92 исследуемых образцов и 2 проб контрольных сывороток в дубликатах (всего 96 определений). Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови выдержали при комнатной температуре (+18+25°C) не менее 30 мин.

### **Алгоритм проведения иммуноферментного анализа по набору «Бруцеллез IgG-ИФА»**

**Приготовление рабочего отмывочного раствора.** Концентрат отмывочного раствора набора необходимого количества развели дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды) и тщательно перемешали.

**Разведение исследуемых образцов.** Расчёт разведения: 400 мкл Буфера для разведения и 10 мкл исследуемой сыворотки. Контрольные сыворотки не развели.

**Приготовление планшета.** Установка на рамку (планшет) необходимое количество стрипов для исследуемых образцов (сывороток) и 4 лунки для контрольных сывороток (отрицательный контроль - 2 лунки, положительный контроль - 2 лунки). Вносили в лунки по 100 мкл положительного и отрицательного контролей и исследуемых образцов (разведенные образцы сыворотки (плазмы)). Аккуратно перемешали содержимое планшета на шейкере, заклеивали планшеты бумагой, предназначенной для этих целей. Инкубировали 60 минут при температуре +37°C. После окончания инкубации удаляли содержимое лунок аспирацией и отмывали лунки 3 раза в вошере. При каждой отмывке добавляли во все лунки не менее 250 мкл отмывочного раствора. Вносили в лунки по 100 мкл конъюгата. Заклеивали планшет бумагой, предназначенной для этих целей. Инкубировали 60 минут при температуре +37°C. Отмывали лунки 5 раз отмывочным раствором. Вносили во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Инкубировали планшет в темноте при комнатной температуре (+18+25°C) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания. Вносили во все лунки по 100 мкл стоп-реagenta. Измеряли величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Бланк фотометра выставляли по воздуху.

**Рассчитывали** содержание IgG антител к антигенам возбудителя бруцеллеза КРС в исследуемых образцах. Для этого:

1. Рассчитали среднее значение оптической плотности (ОП) отрицательного контроля:

$$ОП (CN116BZ)_{cp} = (ОП_1 (CN116BZ) + ОП_2 (CN116BZ)) / 2$$

где, ОП – оптическая плотность (OD); CN – отрицательный (control negative) контроль; cp – средний (mean).

Результаты анализа считали достоверными, если:

- ОП Положительного контроля не ниже 0.4 оптических единиц (ОЕ);
- ОП Отрицательного контроля не выше 0.15 ОЕ во всех лунках.

2. Рассчитывали уровень граничного значения Cut off. Для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавляли коэффициент 0,3. Это значение вносили в Паспорт контроля качества набора.

$$\text{Cut off} = \text{ОП (CN116BZ)}_{\text{ср}} + 0,3$$

3. Рассчитывали Индекс Позитивности (ИП) для каждого исследуемого образца. Для этого ОП образца разделили на значение Cut off.

$$\text{ИП}\% = \text{ОП}_{\text{образца}} / \text{Cut off}$$

*Интерпретацию результатов проводили по разработанной инструкции набора «Бруцеллез IgG-ИФА», согласно следующих оценок:*

При ИП > 1.1 образец положительный;

При ИП < 0.9 – отрицательный.

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результаты считались как находящиеся в пограничной зоне (сомнительный). Такие образцы исследовали повторно. Если повторно полученный результат был неопределенным, то проводили тестирование сыворотки (плазмы), полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считали отрицательными.

### Результаты и обсуждения

При выборочном исследовании в РБП и РА 447 проб сывороток крови от КРС и 20 проб сывороток крови собак, полученных из благополучных по бруцеллёзу хозяйств Джизакской области результаты серологических тестов, были отрицательными, т.е. специфические бруцеллёзные антитела обнаружены не были. Данные результаты РБП и РА сравнительно перепроверены методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием отечественных наборов «Бруцеллез IgG-ИФА». При этом были получены аналогичные отрицательные результаты в ИФА. То есть, при выборочном исследовании набором «Бруцеллез IgG-ИФА» в крови 447 проб сывороток крови КРС и 20 проб сывороток, полученных от собак, были получены отрицательные результаты на IgG антител против бруцеллёза. При этом в лунках с заведомо положительными (контрольными) сыворотками были получены положительные результаты. Полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности отечественных наборов «Бруцеллез IgG-ИФА» при диагностике бруцеллёза.

При проведении испытаний в Самаркандской области в группе сывороток крови, полученных выборочно от 126 голов МРС и присланных для установления иммунного фона на бруцеллёз (т.е. от вакцинированных штаммом Рев-1 животных) получены удовлетворительные результаты, свидетельствующие о наличии

иммунного фона. При этом результаты исследований, полученные при использовании отечественных наборов «Бруцеллез IgG-ИФА» указывали на наличие специфических IgG антител в сыворотке крови иммунизированных животных в 100% случаев, тогда как по реакции агглютинации (РА) реагировало всего 91% иммунизированных животных.

### Выводы

Таким образом, испытание наборов ИФА - «Бруцеллез IgG-ИФА» изготовленных на производственном участке базы НИИВ показали высокую их специфичность и активность по сравнению с традиционным классическим методом РА предназначенного для скрининговой диагностики, что является основанием о возможном применении данных отечественных наборов на практике для диагностики бруцеллёза среди животных и оценки поствакцинального иммунного статуса среди них.

### Использованная литература

1. Шумилов К.В. Разработка и усовершенствование средств методов специфической профилактики и диагностики бруцеллеза животных: Дисс. д.в.н.- М.: 87 С.46.
2. Ясенявская А.Л., Генатулина Г.Н, Арнаутова К.Ш. «Методы иммуноферментного анализа в современной лаборатории» Астрахань.
3. Нестерова И.Г., Бобкова М.Р. Внутрелабораторный контроль качества неколичественных методов ИФА-определения серологических маркёров различных инфекций// Клиническая лабораторная диагностика. - №6.-2011.
4. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Москва:Мир, 2002.
5. Poulou A, et al. 2006. A rare case of *Brucella melitensis* infection in an obstetrician during the delivery of a transplacentally infected infant. J. Infect. 53:39–41.