

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Богданович, Т.М. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae* / Т.М. Богданович, О.У. Стецюк, [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – №2. – Т.2. – 2000. – С.93–109.
- 2 Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц: в 3 ч. Ч.1 (под ред. Кэлнека и др.), 10-е изд-е. – М.: «Аквариум Принт», 2011. – С.208–221.
- 3 Шевченко, А.А. Диагностика гемофилезов животных: учебное пособие / А.А. Шевченко, О.Ю. Черных, Л.В. Шевченко [и др.] // Кубанский государственный аграрный университет, 2013. – 21 с.
- 4 Чернышов, А.В., Ручнова, О.И., Прунтова, О.В. Характеристика культурально-морфологических и биохимических свойств изолятов *Avibacterium paragallinarum*, выделенных на территории Российской Федерации / А.В. Чернышов, О.И. Ручнова [и др.] // Ветеринарная патология. – №3. – 2011. – С.103–107.
- 5 *Ascari Badouei, M. [et al.] Isolation and molecular identification of Avibacterium paragallinarum in suspected cases of infectious coryza // Turkish Journ. of Vet. and Anim. Sciences, (2014); 38. – P.46–49.*
- 6 Blackall, P.J., Christensen, H., Bisgaard, M. [et al.]. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen.nov., *Avibacterium paragallinarum* gen.nov., *Avibacterium avium* comb.nov. and *Avibacterium volantium* comb.nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2005); 55. – P. 353–362.
- 7 Sharmin Akter [et al.]. Isolation and identification of *Avibacterium paragallinarum* from layer chickens in Gazipur, Bangladesh // *Microbes and Health, June 2014, 3 (1).* – P. 9–11.
- 8 Wafaa A. Evaluation of autogenous *Avibacterium paragallinarum* bacterins in chickens // *Int. Journal of Poultry Sciences 10 (1), 2011.* – P.56–61.

УДК 619:616-07

Арабей А.А., научный сотрудник\*

Жаворонок С.В., доктор медицинских наук, профессор\*

Бутько Л.В., старший научный сотрудник, кандидат биологических наук\*

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор\*\*

\*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

\*\*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКА А ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВГЕ У ЖИВОТНЫХ

### Резюме

Применение белка А в иммуноферментном методе исследования неоднократно подтверждало свою рациональность в выявлении специфических антител в сыворотке и плазме млекопитающих. В данном исследовании продемонстрирована возможность использования белка А в идентификации антител к вирусу гепатита Е в плазме свиней и кроликов.

### Summary

A species-independent enzyme-linked immunosorbent assay based on chimeric protein A was established for the detection of antibodies in mammalian serum and plasma. The binding of the antibodies from the respective species to protein A were also evaluated in the iELISA. We demonstrated the use of protein A in detection of hepatitis E virus antibodies in pigs and rabbits plasma.

Поступила в редакцию 15.06.2016 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Белок А был открыт благодаря исследованию штаммов *S. aureus* в 1940г.

Почти все изоляты *S. aureus* экспрессируют этот вирулентный протеин, который располагается как на поверхности

бактериальной стенки, так и в межклеточном пространстве. Белок А представляет собой высоко стабильный поверхностный рецептор с молекулярной массой 42 кДа, включающий в себя от четырёх до пяти иммуноглобулин-связывающих домена, способных ассоциироваться с Fc фрагментом различных изотипов IgG млекопитающих, а также с Fab фрагментом иммуноглобулинов M и G [1]. Исследования показали, что белок А способен связываться с человеческими IgG 1,2,4 изотипов, мышинными IgG 1,2ab,4 изотипов, а также с IgG коровы, морской свинки, хомяка, лошади, свиньи и кролика [2]. Благодаря своим свойствам белок А активно используется для исследований в области иммунологии, а также с целью получения очищенных иммуноглобулинов из биологических жидкостей.

В связи с распространением вируса гепатита E (ВГЕ) среди животных, выращиваемых человеком на фермерских угодьях, становится актуальным вопрос их обследования на носительство ВГЕ. Основным источником инфекции для человека являются домашние свиньи. Территориальные филогенетические исследования отдельных регионов показали, что штаммы ВГЕ, циркулирующие среди свиней и людей, являются родственными, доказывая тем самым автохтонный зоонозный путь передачи вируса [3]. Например, во Франции зарегистрировано одинаковое соотношение подтипов ВГЕ3f, 3с, и 3е среди населения и популяции свиней [4]. Данные исследования могут выступать в качестве доказательств, подтверждающих гипотезу зоонозного пути передачи ВГЕ через употребление в пищу плохо термически обработанной свинины. Кроме того, на сегодняшний день достаточно широко распространено выращивание кроликов с целью получения мяса и шкур. Однако до конца не выяснено, могут ли штаммы ВГЕ, поражающие кроликов, инфицировать человека. Благодаря исследованиям диких популяций кроликов и кроликов, выращи-

ваемых на фермерских хозяйствах в Китае, США и Европе, учёные описали штаммы ВГЕ, вызывающие заболевание у этих животных. Оказалось, что штамм ВГЕ, циркулирующий среди кроликов, является родственным по отношению к человеческому, подтверждая возможность зоонозного пути передачи [5, 6]. Так как существует вероятность заражения человека через употребление в пищу плохо обработанного мяса и субпродуктов, полученных от больных животных, то её необходимо исключить или снизить до минимального уровня.

**Целью** данного исследования являлось выявление иммуноглобулинов к ВГЕ в сыворотке свиней и плазме кроликов методом иммуноферментного анализа с использованием белка А в качестве конъюгата.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась сыворотка, полученная от свиноматок отечественного свинокомплекса, а также плазма, полученная из образцов крови исследуемой группы кроликов, содержащихся в условиях вивария. В качестве контроля использовали сыворотки здоровых доноров, а также пациентов, перенёсших ВГЕ.

Качественное определение антител к ВГЕ осуществляли с помощью набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов к вирусу гепатита E ЗАО «Вектор-Бест». Вместо специфического конъюгата моноклональных антител использовали рекомбинантный белок А, меченый пероксидазой хрена. Анализ проводили по следующей схеме: в первую лунку планшета с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГЕ вносили 100 мкл положительного контроля, во 2 и 3 – по 100 мкл отрицательного контроля, в остальные лунки вносили исследуемые образцы сывороток и плазмы, разведённых в 10 раз; планшет инкубировали 30 минут при температуре 37°C, затем промывали 5 раз промывочным раство-

ром; вносили по 100 мкл раствора белка А; инкубировали 30 минут при температуре 37°C, затем промывали 5 раз, после чего вносили во все лунки по 100 мкл ТМБ и инкубировали 25 минут в темноте; вносили по 100 мкл стоп-реагента и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 450 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В данном исследовании мы проанализировали 61 образец сывороток и плазм, из которых 18 принадлежали свиноматкам, 18 – кроликам и 25 – людям. Среди 25 образцов, полученных от людей, 10 было заведомо положительных на анти-IgG к ВГЕ и 15 – отрицательных. В результате иммуноферментного анализа из 18 сывороток свиноматок 2 оказались положительными и 2 в «серой зоне», что может быть обусловлено перекрёстной реакцией. Из 18 образцов плазмы кроликов у 2-х также выявлены антитела. Все заведомо положительные образцы человеческих сывороток показали положительный результат, все заведомо отрицательные – отрицательный. Положительный и отрицательный контроли из коммерческой тест-системы также показали соответствующие результаты, что свидетельствует о достоверности данного исследования.

В настоящее время интенсивно разрабатываются методы иммуноферментного анализа, обладающие по сравнению с другими способами детекции антител высокой чувствительностью, которая определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата; возможностью использования минимальных объемов исследуемого материала; высокой скоростью воспроизведения; полной безопасностью определений; стабильностью при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА; простотой проведения реакции; наличием как визуального, так и инструментального учета.

Высокая производительность иммуноферментного анализа, возможность унификации и стандартизации диагностических тест-систем, а также автоматизация учета результатов делают данный метод наиболее предпочтительным при проведении массовых серологических исследований.

В отечественных и зарубежных иммуноферментных тест-системах, рассчитанных на определение антител различной специфичности в сыворотках крови, применяют конъюгаты антивидовых антител (против иммуноглобулина G человека) с ферментами-маркерами. Однако способ получения антивидовых антител, включающий использование животных, достаточно трудоемок и длителен по времени [7].

В качестве универсального детектора в ИФА широко используется белок А стафилококка, меченый каким-либо ферментом. Универсальность этого конъюгата объясняется уникальной способностью белка А образовывать прочный комплекс с Fc-фрагментом иммуноглобулина G человека и различных млекопитающих [8, 9]. Ещё в 1978 году Лангон предложил метить йодом данный белок с целью его применения в радиоиммунологическом анализе [10].

В связи с актуальностью исследования по выявлению ВГЕ у животных, употребляемых человеком в пищу, мы решили провести качественный анализ образцов сывороток крови свиней и кроликов с применением конъюгата белка А и пероксидазы хрена на выявление специфических иммуноглобулинов.

Для успешного лечения и своевременной профилактики инфекционных заболеваний животных необходима ранняя и точная диагностика, которую возможно провести только при использовании высокочувствительных и специфических тестов. Этим требованиям отвечают серологические методы, где используют меченые флюоресцирующими красителями,

изотопами или ферментами антигены и антитела. Применение моноклональных антител для получения антисывороток повышает специфичность компонентов и позволяет преодолеть неспецифические реакции. В литературе описано достаточно много примеров использования белка А, меченого пероксидазой хрена, для титрования антител методом ИФА при ринотрихите крупного рогатого скота, вирусном герпесе человека, герпесе лошадей, псевдобешенстве, аденовирусных инфек-

циях крупного рогатого скота, свиней, кошек, собак, кроликов, чуме крупного рогатого скота и ящуре [11].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование белка А стафилококка в качестве достойной замены специфического конъюгата моноклональных антител расширяет сферу применения ИФА и является более экономичным, о чём свидетельствует проведённое нами исследование.

### ЛИТЕРАТУРА

- 1 O'Halloran, D.P., Wynne, K., Geoghegan, J.A. Protein A Is Released into the *Staphylococcus aureus* Culture Supernatant with an Unprocessed Sorting Signal. *Infect Immun.* 2015; 83(4): 1598–1609.
- 2 Michael, D., Boyle, P. Bacterial Immunoglobulin-Binding Proteins: Applications in Immunotechnology. – P.387–388
- 3 Fu, H., Li, L., Zhu, Y., Wang, L., Geng, J., Chang, Y., Xue, C., Du, G., Li, Y., Zhuang, H. 2010. Hepatitis E virus infection among animals and humans in Xinjiang, China: possibility of swine to human transmission of sporadic hepatitis E in an endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82:961–966.
- 4 Bouquet, J., Tesse, S., Lunazzi, A., Eloit, M., Rose, N., Nicand, E., Pavio, N. Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17:2018–2025.
- 5 Izopet, J., Dubois, M., Bertagnoli, S., Lhomme, S., Marchandeuau, S., Boucher, S., Kamar, N., Abravanel, F., Guerin, J.L. 2012. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1274–1281.
- 6 Cossaboom, C.M., Cordoba, L., Cao, D., Ni, Y.Y., Meng, X.J. Complete genome sequence of hepatitis E virus from rabbits in the United States. *J. Virol.* 86:13124–13125.
- 7 Вязникова, Т.В. Конструирование иммуноферментных тест-систем на основе авидин-биотинового взаимодействия для определения антител (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-НВs). Автореферат. – 2007г.
- 8 Азаренок, К.С. Способы обнаружения антигенов и антител с помощью белка А стафилококка / К.С. Азаренок, В.М. Семенов // Лаб. дело.–1987.– № 4.–С. 304–307.
- 9 Акатов, А.К. Стафилококки/ А.К. Акатов, В.С. Зуева // М.: Медицина, 1983.–256 с.
- 10 Langone, J.J., Boyle, M.D., Borsos, T. Studies on the interaction between protein A and immunoglobulin G. II. Composition and activity of complexes formed between protein A and IgG. *J Immunol.* 1978 Jul;121(1):333–338.
- 11 Самуйленко А.Я. Иммуноферментный анализ в ветеринарной медицине. / А.Я. Самуйленко, Д.П. Кузнецов, С.В. Кузнецова // Ветеринария, 2003.– №12.