

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Боровиков С.Н., Жармышева М.Е.

Аннотация

В статье приведены данные по конструированию иммунохроматографического теста для экспресс-диагностики кампилобактериоза крупного рогатого скота в биологическом и патологическом материале. Приведены методы конъюгирования моноклональных антител (специфичны к антигенным детерминантам возбудителя болезни - *Campylobacter fetus*) с наночастицами коллоидного золота и изучены их свойства. Определены оптимальные параметры нанесения реагентов на нитроцеллюлозную мембрану для формирования тестовой и контрольной зоны. Изготовлена опытная партия тестов и проведен отбор образцов биологического материала от животных из различных хозяйств для проведения лабораторных испытаний. Определение чувствительности и специфичности разработанного ИХА-теста, и в целом его пригодности для диагностики кампилобактериоза определяли в сравнении с коммерческими аналогами и методом ПЦР-анализа. Отмечена высокая корреляция полученных результатов между сравниваемыми тестами, что позволяет сделать вывод о возможности использования разработанного теста в ветеринарной практике.

Ключевые слова: кампилобактериоз, крупный рогатый скот, антитела, антиген, диагностика, коллоидное золото, конъюгат, иммунохроматография, экспресс-тест.

Введение

Кампилобактериоз – инфекционное заболевание сельскохозяйственных животных, характеризующееся абортами, бесплодием, у молодняка – энтеритами и высокой летальностью [1]. Во многих странах отмечается высокий уровень его распространения [2,3,4]. Носителями кампилобактеров являются различные виды домашних и диких животных, а также птица. Из

организма млекопитающих выделение вибрионов в окружающую среду происходит с молоком, истечениями из половых органов, спермой, абортированным плодом, плацентой, фекалиями. Распространение возбудителя осуществляется через корм, подстилку, волю, продукцию животноводства.

Восприимчивость и механизм эпизоотического процесса среди видов животных имеет

особенности. В скотоводстве основным источником возбудителя служат быки-производители и больные коровы. Заражение происходит половым путем при спаривании особей, через сперму при искусственном осеменении, при контакте с инфицированными животными. Присутствие вибрионов обнаруживается в вагинальной слизи, в смывах из препуция. У крупного рогатого скота патология характеризуется комплексным поражением органов размножения, в процесс вовлекаются слизистые оболочки влагалища, матки, яйцеводов и яичники. Плодоношение нередко на 4-7 месяце стельности прерывается абортom. Динамика развития воспалительного процесса продолжается 4-5 месяцев. В этот период на ранней стадии развития возможна гибель плода, которая просматривается и о ней можно говорить по течке, наступающей в отдаленные сроки. У быков, больных кампилобактериозом отмечают гиперемии слизистой оболочки препуция и полового члена, обильное выделение слизи в течение 2-3 дней после заражения. В дальнейшем перечисленные признаки исчезают, процесс протекает бессимптомно в виде бактерионосительства [5].

Значительный экономический ущерб при кампилобактериозе в скотоводстве складывается за счет абортов, перегулов у коров, снижения молочной продуктивности, наложения ограничительных мероприятий, затрат на проведение противоэпизоотических

мероприятий. Установлено, что в неблагополучных хозяйствах недополучают по 15-20 телят на 100 маток, каждая корова за период дней бесплодия снижает надой на 500 и более литров молока [6].

Диагноз на кампилобактериоз устанавливают на основании клинических, эпизоотологических, патологоанатомических и лабораторных методов исследования. Важное значение при постановке диагноза на кампилобактериоз отводится лабораторным анализам. Для диагностики кампилобактериоза в ветлабораториях РК используют бактериологические, биологические и серологические методы. Серологическую диагностику проводят путем постановки РА, РСК (РДСК) и методом флуоресцирующих антител. У крупного рогатого скота обычно РА ставят с влагалищной слизью (РАВС). Однако данные методы не обеспечивают постановки точного диагноза и занимают значительное время для их постановки. Основным методом является бактериологический, однако, бактериологическая диагностика кампилобактериоза очень трудоемка, для роста бактерий требуются условия с повышенным содержанием CO_2 и дорогостоящие селективные среды [7].

Широко используемый в настоящее время иммуноферментный анализ (ИФА) может быть использован при массовых исследованиях, но его недостатком является обязательное наличие специального

оборудования и подготовленного персонала [8,9].

Согласно рекомендациям МЭБ, для выявления и дифференциации кампилобактерий, могут использоваться ПЦР и ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Разработаны мультиплексные ПЦР тест-системы, позволяющие проводить одновременное выявление и дифференциацию *Campylobacter fetus* от других видов кампилобактерий [10,11,12]. Однако, применение ПЦР в ветлабораториях затруднительно, из-за высокой стоимости оборудования и тест-систем (праймеров).

В связи с вышеизложенным, возникает необходимость разработки простых и эффективных тестов для диагностики этой инфекции. В последние годы

Материалы и методика исследований

Работа проводилась в Научно-исследовательском институте сельскохозяйственной биотехнологии, клинике факультета ветеринарной медицины АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина» и хозяйствах Акмолинской области.

В работе использовали лабораторных животных: кроликов, белых беспородных мышей и мышей линии *Valb/c*.

Материалы.

Золотохлористоводородная кислота HAuCl_4 («Sigma-Aldrich», США), антивидовые конъюгаты, нитроцеллюлозные мембраны типов *CNPF* (5 μ), *CNPF* (8 μ), *CNPF* (10 μ), *CNPC* (15 μ), мембраны под образец (*TYPE-GBF-*

наночастицы коллоидного золота (КЗ) используются как эффективные оптические преобразователи биоспецифических взаимодействий для разработки биочипов и биосенсоров. Подобные устройства представляют большой интерес для медицины и ветеринарии (скрининг лекарственных веществ, диагностика инфекций). Используя КЗ в качестве маркера, разработаны экспресс-тесты на основе иммунохроматографии, которые позволяют проводить анализ вне лабораторий, без использования оборудования и получать результат в течение 15 минут [13,14].

Целью работы является разработка иммунохроматографического теста (ИХА) для экспресс-диагностики генитального кампилобактериоза крупного рогатого скота.

В Научно-исследовательском институте (*R7L*), стекловолоконные крупнопористые мембраны для нанесения коллоидного конъюгата (*TYPE-PT-R5*) и адсорбирующие мембраны (*TYPE-AP-045*) производства фирмы *Advanced Microdevices (AmbalaCantt, Индия)*.

Реактивы и расходные материалы для проведения молекулярно-генетических исследований (ПЦР-анализ). Реактивы и расходные материалы для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунохроматографического анализа. Коммерческие наборы «РЭД *Campylobacter*» для выявления возбудителя

кампилобактериоза в биологических объектах (Россия).

Образцы биологического материала (смывы с препуция, влагалищная слизь, молоко и фекалии от крупного рогатого скота) отбирали от животных из хозяйств Акмолинской области: 30 образцов влагалищной слизи от коров из КХ «Жана береке» Ерементауского района, 20 образцов от коров агрофирмы «Родина», 12 образцов от коров из АО «Астана-Өнім» Целиноградского района.

Методы. При проведении исследований применялись иммунохимические, биотехнологические, серологические, молекулярно-генетические и другие методы.

Специфические поликлональные антитела (ПКА) получены путем иммунизации лабораторных животных. Моноклональные антитела (МКА), специфичные к эпитопам антигенов *Campylobacter fetus spp. venerealis*, получены одним из методов клеточной инженерии (гибридомная техника).

Приготовление коллоидного золота. Растворы коллоидного золота с заданным размером частиц получали по методу Френса. Для этого 0,01% водный раствор золотохлористоводородной кислоты $HAuCl_4$ («Sigma») нагревали до кипения в колбе с магнитной мешалкой, а затем при активном перемешивании добавляли 1,8 мл 1 %-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили в течение 15 мин, затем охлаждали и хранили при температуре 4–6 °С.

Определение концентрации антител. Оптимизацию проводили на 96-луночном полистироловом планшете, выбирали 8 рядов по 6 лунок. Каждый ряд соответствовал фиксированному значению рН, а каждый столбец – определенной концентрации антител. В аликвотах (по 2,5 мл) суспензии коллоидного золота доводили рН до значений в диапазоне от 6 до 10 с шагом 0,5, добавляя 0,1М раствора карбоната калия. В лунки планшета вносили по 200 мкл растворов коллоидного золота с соответствующими значениями рН и по 20 мкл растворов антител с концентрациями 30, 60, 120, 180, 360 мкг/мл в деионизованной воде. Реакционную смесь перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 мин, добавляли по 0,1 мл 10%-го раствора NaCl. Измеряли оптическое поглощение в лунках планшета на длинах волн 520 и 580 нм и строили ее зависимость от концентрации антител.

Приготовление конъюгата наночастиц золота с антителами. Антитела диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ трис-*HCl* буфера, рН 8,5, в течение 2 ч при 4 °С. К 100 мкл раствора антител в деионизированной воде добавляли по 1 мл раствора коллоидных частиц, перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробу добавляли по 100 мкл 10 %-ного хлорида натрия, перемешивали. К раствору коллоидного золота добавляли 0,2 М K_2CO_3 до достижения рН 8.5 и вносили в раствор антител

выбранной концентрации. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивании, затем вносили БСА до конечной концентрации 0.25 %. Частицы золота с иммобилизованными на них антителами отделяли от несвязавшихся антител центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), рН 7,4, содержащем 0,25% БСА. При необходимости длительного хранения к полученному продукту добавляли азид натрия до конечной концентрации 0,01 % [15].

Дот-иммуноанализ. В первый ряд 96-луночного планшета вносили 50 мкл антигена и титровали в 50 мкл ФСБ. Дот анализ выполняли на нитроцеллюлозных мембранах с диаметром пор 0,2 мкм. Испытуемый материал каплями в объеме 1 мкл наносили на нитроцеллюлозные мембраны. Для блокирования сайтов неспецифической адсорбции, мембраны после нанесения материала, выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 60 минут при комнатной температуре в буфере - *Blocking buffer* 10^x. Для обнаружения антигена нитроцеллюлозные полоски после обработки помещали в чашки Петри и инкубировали в растворе конъюгата КЗ+МКА 15 минут [18].

Изготовление иммунохроматографического композита. Растворы конъюгатов

наносили в объеме 11 мкл на стекловолокнистые мембраны «*Advanced Microdevices*» (Индия). На полоски основной мембраны наносили раствор специфических антител в фосфатно-солевом буфере с помощью программируемого автоматического диспенсера *Easy Printer Модель LMP-0.2* для формирования аналитической зоны. Для формирования контрольной зоны системы на расстоянии 5 мм от аналитической зоны наносили раствор антивидовых антител с концентрацией 1 мг/мл. Мембраны высушивали в течение суток при комнатной температуре и склеивали. Полученные поликомпозиционные листы с нанесенными иммунореагентами нарезали на тест-полоски с помощью аппарата «*SS-Программируемый аппарат*» для нарезания полоски «*Advanced Sensor system*» (Индия). Полоски хранили при комнатной температуре в герметично закрытой упаковке (влажность 25–30%).

Проведение ИХА и регистрация его результатов. ИХА проводили при комнатной температуре. Исследуемую пробу, в объеме 80-100 мкл, вносили на подложку для внесения образца. При наличии в анализируемом образце искомого антигена, они связывались с МКА, конъюгированными с частицами коллоидного золота, образуя окрашенный комплекс. Этот комплекс движется по мембране и связывается со специфическими

ПКА, иммобилизованными на мембране в тестовой зоне планшета, образуя окрашенную линию на уровне маркировки Т (тест). Избыток конъюгата образует комплекс с *Antimouse Ig G* в виде линии на уровне маркировки С (контроль). Учет результатов реакции проводится визуально. Положительная реакция, т.е. обнаружение антигенов, характеризуется появлением на мембране двух окрашенных линий (в тестовой и контрольной зонах). При отрицательной реакции образуется одна линия в зоне контроля. Реакция должна быть положительной по отношению к контрольному антигену. Если после проведения анализа не образовалась линия в зоне контроля, результат считается некорректным и подлежит повторному анализу.

Отбор образцов для исследования. У быков, для смыва с препуция, 20-30 мл *PBS* вводили в полость препуциального мешка. После энергичного массажа 15-20 секунд, жидкость собирали в стерильные пробирки и доставляли в лабораторию. У коров отбирали влагилицную слизь. Образцы получали путем аспирации, или мытьем вагинальной полости, область вульвы очищали фильтровальной бумагой, и вставляли пипетку для искусственного осеменения или пипетку Касса в полость влагилица, так что пипетка достигала шейки матки. Собранную слизь помещали в пробирку с фосфатно-солевым буфером. Также образцы собирали

путем промывки вагинальной полости: 20-30 мл *PBS* вливали в полость через шприц, который прикреплен к пипетке. Собранную слизь помещали в пробирку с фосфатно-солевым буфером и доставляли в микробиологическую лабораторию. Биоптат использовали для микробиологического, иммунохимического и молекулярно-генетических исследований.

Методика выделения ДНК. ДНК выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции с предварительной обработкой протеиназой К. Клеточный осадок ресуспендировали в 300 мкл раствора №1 (100 мМ трис-НСl рН 8,0, 10 мМ ЭДТА, 2 мг/мл лизоцима) и инкубировали 1 час при 37°C. Добавляли 50 мкл раствора №2 (8% додецилсульфат натрия (*SDS*) и 50 мкл протеиназы К (2 мг/мл)). Перемешивали и инкубировали при 42°C, 60 мин, добавляли 200 мкл фенола и 200 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистую пробирку, не затрагивая нижнюю фазу и интерфазу. Проводили повторную экстракцию с 400 мкл хлороформа. К водной фазе добавляли 40 мкл 3 М ацетата натрия (рН 5,4) и 800 мкл 96% этилового спирта, перемешивали и инкубировали 8ч, при - 20°C. ДНК осаждали центрифугированием 15 мин при 12 000 об/мин. Осадок промывали 75% этиловым спиртом, сушили при 37°C и растворяли в 30 мкл воды.

Протокол проведения ПЦР-анализа. ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси состоящей из 10 мкл 5^x буфера, 1 мкл 10 мМ dNTP, 2 мкл праймеров (*forward* и *reverse*), 1 мкл Mg⁺⁺, 1 мкл ДНК-полимеразы, 100 мкг изучаемой ДНК и бидистиллированной воды. Условия термоциклирования включали первоначальную денатурацию при 94°C в течение 10 минут, последующие 35 циклов при 94°C в течение 1 мин., 60°C в течение 1 мин. и 72°C в течение 2 минут. Завершающие 72°C в течение 5 минут использованы для синтеза пост-амплификационных скрытых концов. Результаты ПЦР анализировали в 1% агарозном геле.

Коммерческие наборы «РЭД *Campylobacter*» использовали

Основные результаты исследований НИР

Для создания тестов необходимо изготовление нескольких компонентов, основным из которых является конъюгат (МКА, меченные коллоидным золотом), обладающий высокой специфичностью к антигенам возбудителя.

Растворы коллоидного золота (КЗ) с размером частиц 20 нм были получены путем восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. При этом соблюдалась определенная пропорция добавления реагентов (рисунок 1).



1

2

Примечание: 1- начало процесса; 2-конечный результат

Рисунок 1 – Приготовление коллоидного золота

В процессе исследований, после добавления цитрата натрия цвет раствора изменялся следующим образом: вначале, через несколько секунд после добавления раствор почернел, затем приобретал синеватый оттенок, по истечении 3 минут приобрел винно-красный цвет, который и сохранился после завершения опыта. В результате

проведения данного этапа получено 200 мл раствора коллоидного золота с размером наночастиц 20 нм, рН 6,5.

При создании тест-систем ИХА существенное значение имеет качество конъюгата, от этого зависит интенсивность окраски линии, взаимодействие с антителами и антигеном и т.д. Для конъюгирования определяли

концентрацию иммуноглобулинов, оптимальную для связывания с коллоидным золотом (КЗ). При получении конъюгатов использовали МКА к антигенам возбудителя *Campylobacter fetus spp. venerealis* (концентрация - 4 мг/мл). Для определения концентрации белков, оптимальной для конъюгации с коллоидным золотом в лунки планшета вносили по 200 мкл КЗ с соответствующими значениями рН и по 20 мкл антител с концентрациями 1, 10, 20, 40, 80, 120 мкг/мл. Реакционную смесь перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 мин, добавляли по 0,1 мл 10%-го NaCl. Измеряли оптическое поглощение при 580 нм и строили ее зависимость от концентрации антител.

Для изучения активности конъюгат МКА-КЗ тестировали в точечном (dot- вариант) ИФА: на полоски НЦМ наносили микропипеткой по 1 мкл раститрованного антигена, сушили при комнатной температуре и блокировали места неспецифической сорбции 1%-ым БСА. Для обнаружения антигена полоски инкубировали в растворе конъюгата (МКА-КЗ) 15-20 минут, учет результатов проводили визуально. Положительную реакцию наблюдали в виде образования розовых пятен в местах взаимодействия антигена с конъюгатом через 3-5 мин, интенсивность окраски постепенно усиливалась в течение 1 ч, за счет присоединения свободных активных центров антител, связанных с молекулами

коллоидного золота. Чем выше концентрация антигена, тем интенсивнее проявляется окраска точек проявления. По итогам тестирования определено, что конъюгат, полученный с использованием концентрации антител 10 мкг/мл обладает наибольшей активностью.

Далее определяли чувствительность конъюгата. Для этого раститровывали антиген путем двукратных разведений, до концентрации 1 нг и, каплями в объеме 1 мкл, наносили на нитроцеллюлозные мембраны. Блокировали сайты неспецифической адсорбции 1% BSA. Для обнаружения антигена нитроцеллюлозные полоски после вышеуказанной обработки помещали в чашки Петри и инкубировали в растворе конъюгата 15 минут. Результаты реакции учитывали визуально, положительная реакция характеризуется появлением на мембране розовых точек в местах нанесения антигенного препарата. Конъюгат показал высокую активность по отношению к антигену, чувствительность составила 0,07 мкг/мл. Что позволяет нам использовать данную методику конъюгации для конструирования ИХА-теста. При использовании контрольного антигена, получена отрицательная реакция, еще раз подтверждающая специфичность используемых моноклональных антител.

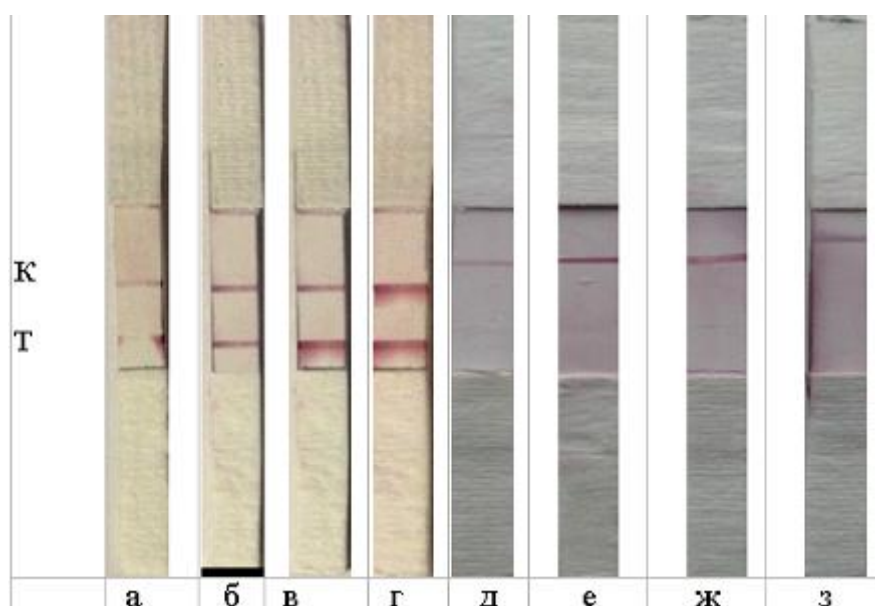
Определены оптимальные параметры нанесения ПКА и антивидовых антител, с целью формирования зон детекции. Для

формирования аналитической и контрольной зоны на мембрану с помощью автоматического диспенсера наносили раствор ПКА и на расстоянии 5 мм раствор антивидовых антител Antimouse Ig G. Полоски сушили при комнатной температуре до полного высыхания. Для оптимизации концентрации ПКА готовили разведения: 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 мкг/мл. Для антивидовых антител использовали концентрации: 2, 3, 5, 7.5, 15, 30, 60 мкг/мл. При нанесении ПКА в концентрации 2000 мкг/мл происходит образование фонового сигнала в связи с избытком антител. Воспроизводимость результата наблюдается при концентрации - 500 мкг/мл. При меньших концентрациях чувствительность анализа заметно снижается, и линии не формируются. Что касается антивидовых антител, присутствие фонового сигнала заметно при концентрации от 7,5 до 60 мкг/мл. При концентрации 5 мкг/мл визуально обнаруживается четкая

полоса. При низких концентрациях полоса в месте взаимодействия конъюгата с антителами становится тусклой.

Из полученных данных следует, что оптимальная концентрация нанесения антител *Antimouse Ig G* в контрольной зоне составляет 5 мкг/мл, а ПКА – 0,1 мг/мл. Внесение антител выше указанного уровня приводит к появлению фонового сигнала. Снижение же концентрации ниже оптимальных значений недостаточно для формирования аналитической и контрольной зон, поскольку это ведет к снижению чувствительности теста.

Отдельно наносили на подложку из стекловолокна раствор конъюгата. С целью определения оптимальной концентрации конъюгата наносимого на подложку подобраны концентрации: 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 15 мкг/мл, 20 мкг/мл, для полосок с 1-ой (д,е,ж,з) и 2-мя (а,б,в,г) зонами детекции (рисунок 2).



Примечание: а, д – 5 мкг/мл; б, е - 10 мкг/мл; в, ж - 15 мкг/мл; г, з - 20 мкг/мл

Рисунок 2 - Подбор оптимальной концентрации внесения конъюгата

Как видно из рисунка 2, взаимодействие антител конъюгата и антител в контрольной зоне и тест-зоне происходит эффективно при концентрации конъюгата 10 мкг/мл. При концентрации конъюгата 5 мкг/мл и менее не происходит специфического взаимодействия и формирования полосы, в случае концентрации более 10 мкг/мл происходит образование фона в связи с избытком антител. Оптимальная концентрация внесения конъюгата на подложку составляет 10 мкг/мл.

Далее определяли оптимальный объем нанесения конъюгата на подложку. На подушку для конъюгата, размером 10x4 мм наносили 7, 9, 11,13, 15 и 20 мкл конъюгата. При нанесении конъюгата в объеме более 9 мкл/мм, подложка полностью пропитывается и образуется неравномерное распределение конъюгата. При внесении конъюгата в объеме 7 мкл/мм подложка не пропитывается. Оптимальным объемом внесения конъюгата на подложку размером 10x4 мм является 9 мкл/мм, что обеспечивает равномерную

пропитку мембраны. Оптимальные значения рН для нанесения раствора антител составляло около 7,5. Таким образом, отработаны основные этапы и параметры изготовления иммунохроматографических тестов для диагностики генитального кампилобактериоза.

Затем проводили подготовку компоненты и сборку теста. Основными компонентами являются: накладка (подушка) для образца, на которую первоначально поступают исследуемая проба и буфер (аналитический раствор); конъюгатная накладка с сорбированным конъюгатом коллоидного золота с МКА к эпитомам антигенов возбудителя *Campylobacter fetus spp. veneralis*; мембрана с иммобилизованными в зоне тестовой линии специфическими ПКА и в зоне контроля антивидовыми антителами *Anti mouse Ig G*, на которой происходит фиксация иммунных комплексов; абсорбентная накладка, впитывающая растворы на последнем этапе.



Рисунок 3- Схема устройства иммунохроматографического теста.

При сборке теста все мембраны должны плотно прилегать друг к другу и обеспечивать свободное перемещение жидкой пробы под действием капиллярных сил. А также использованы другие компоненты для изготовления тестов, производитель фирма «Advanced Microdevices». Далее проводили сборку мембран. На одну сторону нитроцеллюлозной мембраны *CNPF* наклеивали стекловолоконную мембрану для нанесения конъюгата (*TYPE-PT-R5*), поверх мембрану под образец (*TYPE-GBF-R7L*). На другую наклеивали адсорбирующую мембрану (*TYPE-AP-045*). Для формирования аналитической и контрольной зоны на мембрану с помощью автоматического диспенсера наносили раствор специфических антител и на расстоянии 5 мм – раствор *Antimouse IgG*. Полоски помещали на фильтровальную бумагу и сушили при комнатной температуре 10-12ч. Подготовленные полоски мембраны, нарезали с помощью аппарата «SS – программируемый аппарат для нарезания полосок».

Для определения чувствительности теста использовали пробы, содержащие исходный антиген от 1 нг/мл до 500 мкг/мл. Опыт проводили в 3-х повторах, через 15 минут оценивали результат. Порог чувствительности составляет 15нг растворимого антигена. Специфичность определяли путем использования гомологичных и гетерологичных антигенов с известной концентрацией. Взаимодействие компонентов теста происходит при использовании антигена *S. fetus spp. veneralis*, в остальных случаях результаты отрицательные. Таким образом, изготовлены компоненты и проведена сборка иммунохроматографического теста для диагностики кампилобактериоза крупного рогатого скота.

Лабораторные испытания разработанных тестов проводили в сравнении с классическими методами и коммерческими аналогами. Апробацию разработанного ИХА теста проводили при комнатной температуре, образец влагиалищной слизи микропипеткой в объеме 80-100мкл вносили на подушку для внесения образца. При наличии в анализируемом образце искомого антигена, он связывался МКА, конъюгированными с частицами КЗ, образуя окрашенный комплекс. Комплекс двигался по мембране и связывался со специфическими ПКА, образуя линию красного

цвета на уровне маркировки Т (тест). Избыток МКА, конъюгированных с частицами коллоидного золота, образует окрашенный комплекс с антивидовыми антителами *Antimouse IgG* в виде линии красного цвета на уровне маркировки С (контроль).

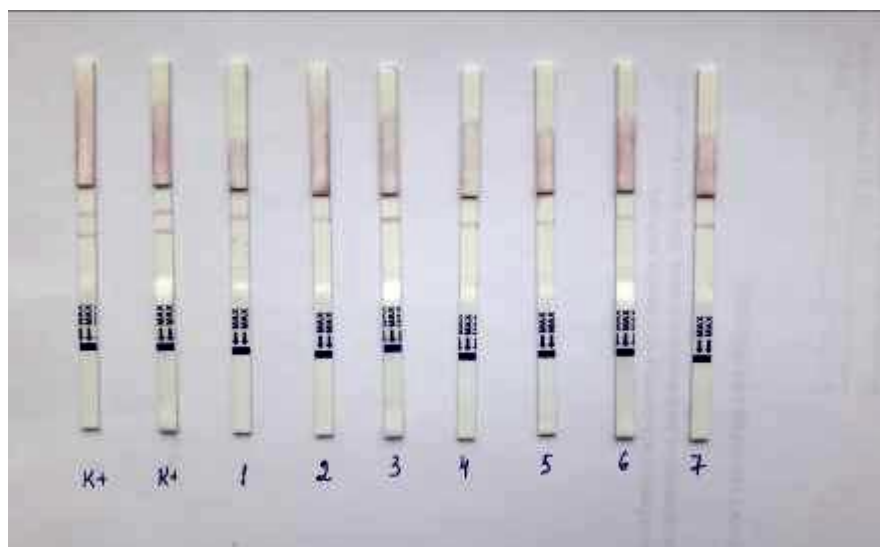


Рисунок 4 - Испытание разработанного ИХА-теста

Учет результатов реакции проводили визуально. Положительная реакция характеризуется появлением на мембране двух окрашенных линий (в тестовой и контрольной зонах). При отрицательной реакции образуется одна линия в зоне контроля. Реакция должна быть положительной по отношению к контрольному антигену. Если после проведения анализа не появлялась линия в зоне контроля, результат

Также, часть этих образцов была исследована с помощью коммерческого набора ИХА «РЭД *Campylobacter*» для выявления

считали некорректным и проводили повторный анализ. В результате исследования методом ИХА ни в одной из исследуемых проб возбудитель *Campylobacter fetus* вида *veneralis* не был обнаружен, тогда как при использовании положительного контроля на тест-мембране было зафиксировано появление двух окрашенных полос, что свидетельствует о положительной реакции.

возбудителя в биологических объектах (рисунок 5).



Рисунок 5 – Коммерческий тест

Кассеты нумеровали в соответствии с номерами пробирок с исследуемыми образцами влажной слизи. Согласно инструкции из пробирки с исследуемым образцом, пипеткой с чистым наконечником отбирали 100 мкл и вносили в «окошко» кассеты. Оставляли в покое на 10 минут при комнатной температуре и визуально проводили учет реакции. В результате анализа в 9 случаях проявилась одна полоса в контрольной зоне, что свидетельствует о получении отрицательных результатов. В одном случае тест не сработал и

признан недействительным. В случае внесения положительного контроля обнаружено наличие двух цветных полос, что подтверждает положительную реакцию.

Эти же пробы исследовали методом ПЦР-анализа в лаборатории молекулярно-генетических исследований «Платформы сельскохозяйственной биотехнологии» КАТУ им. С. Сейфуллина. Выделение ДНК осуществляли методом фенольно-хлороформной экстракции. На рисунке 4 приведена диаграмма соотношения содержания ДНК.

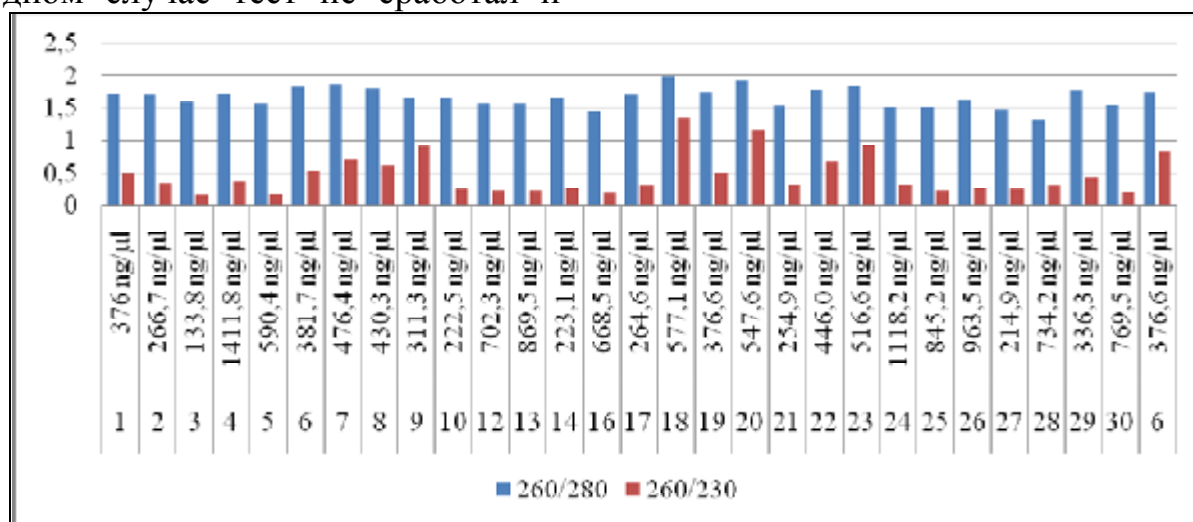


Рисунок 6 - Содержание ДНК при длине волн 260/280 и 260/230 нм

Оптимальная программа для идентификации кампилобактерий, с

использованием праймеров, специфичных к нуклеотидной

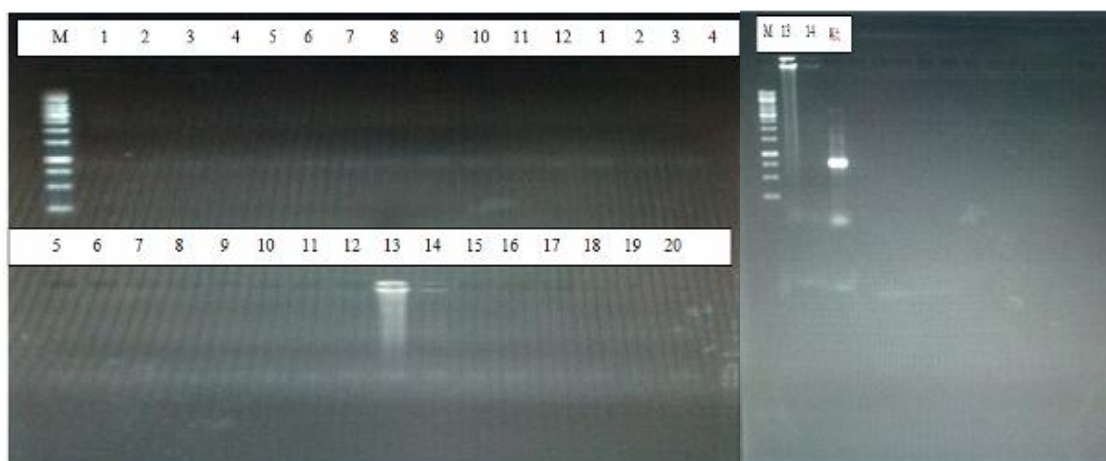
последовательности *Campylobacter fetus* приведена в таблице 1.

Таблица 1- Последовательности праймеров, используемых для ПЦР-анализа

Род	Размер	Праймер	Последовательность (5'-3')	Источник
<i>Campylobacter</i>	816 п.н	<i>C412F</i>	<i>GC1:5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3'</i>	<i>Linton et al.</i>
		<i>C1228R</i>	<i>GC2:5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'</i>	<i>Linton et al.</i>

Методом ПЦР-анализа исследованы доставленные образцы материала от животных. В результате, во всех случаях, за исключением образца №13

(агрофирмы «Родина»), были получены отрицательные результаты (рисунок 7А). Образец №13 был подвержен повторному анализу (рисунок 7В).



А

В

Рисунок 7- Результаты ПЦР-анализа

Как видно из рисунка 7, при проведении повторного анализа образца №13 получена отрицательная реакция, при этом контроль (к+) сработал в стандартном варианте. В

результате ПЦР-анализа наличие возбудителя кампилобактериоза в исследуемых пробах не установлено, данные совпадают с результатами, полученными другими методами.

Обсуждение полученных данных и заключение

В результате проведения исследований подобраны оптимальные методы конъюгирования специфических антител и коллоидного золота. Получены конъюгированные препараты, изучена их активность по отношению к антигену в ДОТ – иммуноанализе. Определены

оптимальные параметры нанесения поликлональных и антивидовых антител для формирования зон детекции: для формирования «тестовой зоны» оптимальная концентрация ПКА составила 0,1 мг/мл, а антивидовых антител в «контрольной зоне - 5 мкг/мл».

Оптимальная концентрация внесения конъюгата на подложку составляет 10 мкг/мл. Наиболее приемлемым объемом внесения конъюгата на подложку размером 10x4 мм является 9 мкл/мм, что обеспечивает равномерную пропитку мембраны. Оптимальные значения рН для нанесения раствора антител составляло около 7,5. Порог чувствительности теста составляет 15 нг растворимого антигена. Специфичность теста определяли путем использования антигенов гомологичных и гетерологичных микроорганизмов, взаимодействие компонентов теста происходит только по отношению к антигену *C. fetus spp. venerealis*.

После завершения подготовительных работ изготовлены компоненты и проведена сборка иммунохроматографического теста для диагностики генитального кампилобактериоза крупного рогатого скота. Проведены лабораторные испытания разработанного теста в сравнении с методом ПЦР-анализа и коммерческим тестом ИХА. В результате исследования методом ИХА ни в одной из 62 исследуемых проб не был обнаружен возбудитель *Campylobacter fetus* вида *venerealis*, тогда как при использовании положительного контроля на тест-мембране было зафиксировано появление двух окрашенных полос, что свидетельствует о положительной реакции.

Также, часть образцов была исследована с помощью

коммерческого набора ИХА «РЭД *Campylobacter*» для выявления возбудителя в биологических объектах, результаты подтвердили данные разработанного ИХА-теста.

Для изучения эффективности разработанного теста параллельно были проведены исследования этих же проб методом ПЦР-анализа с использованием праймеров, предназначенных для выявления возбудителя *Campylobacter fetus*. В результате исследования данных образцов методом ПЦР ни в одном случае наличие ДНК возбудителя этой инфекции выявлено не было.

Таким образом, проведены лабораторные испытания разработанного теста в сравнении с классическими методами исследования, методом ПЦР-анализа и коммерческим тестом ИХА. В результате получены идентичные данные, подтверждающие отсутствие в исследованных образцах влагалищной слизи коров наличие возбудителя кампилобактериоза. Лабораторные испытания подтверждают эффективность разработанного теста, поскольку позволяют получить результаты в течение 15 минут, без использования дополнительного оборудования.

Таким образом, разработан иммунохроматографический тест для обнаружения возбудителя генитального кампилобактериоза крупного рогатого скота, который может быть рекомендован для ветеринарной практики.

Список литературы

- 1 Иванов В.П., Бойцов А.Г., Порин А.А. Кампилобактеры и кампилобактериозы. -СПб, 1995. -144с.
- 2 Vargas AC, Costa MM, Vainstein MH, Kreutz LC, Neves JP. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil // *Vet Microbiol.* – 2003. – Vol. 93 (2). – P. 121-132.
- 3 Sadkowska-Todys M, Kucharczyk B. *Campylobacteriosis* in Poland in 2012 // *Przegl Epidemiol.* – 2014. – Vol. 68 (2). – P. 239-241.
- 4 Ramonaitė S, Rokaitytė A, Tamulevičienė E, Malakauskas A, Alter T, Malakauskas M. Prevalence, quantitative load and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in dairy cattle herds in Lithuania // *Acta Vet Scand.* – 2013. – Vol. – P. 55-87.
- 5 Лэйзер М., Ванг В. Этиология // В кн.: Кампилобактериоз / Н.А.Чайка, Л.Б.Хазенсон, Ж.П.Бутцлер и соавт. – М., 1988. – С. 9-31.
- 6.Кириянов Е.А. Кампилобактериоз животных: Лекция.- Примор. СХИ/Сельскохозяйств. ин-т.-Уссурийск,1992.-23с.
- 7 Белоусов В.И., Гусев А.А. Актуальные проблемы лабораторной диагностики заразных болезней животных // *Ветеринария.* – 1999. – М. – С. 3-6.
- 8 Zhao H, Liu H, Du Y, Liu S, Ni H, Wang Y, Wang C, Si W, Yang J, Ling J. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle. // *Res Vet Sci.* – 2010. – Vol. 88 (3). – P. 446-451.
- 9 Brooks BW, Devenish J, Lutze-Wallace CL, Milnes D, Robertson RH, Berlie-Surujballi G. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples // *Vet Microbiol.* – 2004. – Vol. 103 (1-2). – P. 77-84.
- 10 Wagenaar JA, van Bergen MA, Newell DG, Grogono-Thomas R, Duim B. Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals // *J Clin Microbiol.* – 2001. – Vol. 39 (6). – P. 2283-2286.
- 11 Willoughby K, Nettleton PF, Quirie M, Maley MA, Foster G, Toszeghy M, Newell DG. A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* -species *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp // *J Appl Microbiol.* – 2005. – Vol. 99 (4). – P. 758-766.
- 12 Chaban B, Chu S, Hendrick S, Waldner C, Hill JE. Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples // *Can J Vet Res.* – 2012. 76 (3). – P. 166-173.
- 13 Gaiping Zhang, Junqing Guo, Xuannian Wang. Immunochromatographic Lateral Flow Strip Tests By // *Methods in Molecular Biology.* – 2008. – Vol. 504 (11). – P. 169-183.

14 Michel, AL; Simoes, M. Comparative field evaluation of two rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in African buffaloes (*Syncerus caffer*) // *VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY*. – 2009. T.127, V. 1-2. – P.186-189

15 Dykman, LA, Colloidal Gold in Biochemical and Microbiological Investigations. Diss. to the soisk. uch. Art. Doctor of Biol. sciences. – Saratov, 2006. – P. 135

References

1 Ivanov VP, Boytsov AG, Porin AA. *Campylobacter* and *Campylobacteriosis*. – St. Petersburg, 1995. –144p.

2 Vargas AC, Costa MM, Vainstein MH, Kreutz LC, Neves JP. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil // *Vet Microbiol*. – 2003. – Vol. 93 (2). – P. 121-132.

3 Sadkowska-Todys M, Kucharczyk B. *Campylobacteriosis* in Poland in 2012 // *Przegl Epidemiol*. – 2014. – Vol. 68 (2). – P. 239-241.

4 Ramonaitė S, Rokaitytė A, Tamulevičienė E, Malakauskas A, Alter T, Malakauskas M. Prevalence, quantitative load and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in dairy cattle herds in Lithuania // *Acta Vet Scand*. – 2013. – Vol. – P. 55-87.

5 Leyzer M., Wang V. Etiology // In the book: *Campylobacteriosis* / NA Chaika, LB Khazenson, Zh.P. Butzler et al. – M., 1988. – P. 9-31.

6 Kiryanov EA. *Campylobacteriosis of animals: Lecture*. Primorye Agricultural Institute. – Ussuriysk, 1992. –23p.

7 Belousov VI, Gusev AA. Actual problems of laboratory diagnostics of contagious animal diseases // *Veterinary Medicine*. –1999. – №2. – P. 3-6.

8 Zhao H, Liu H, Du Y, Liu S, Ni H, Wang Y, Wang C, Si W, Yang J, Ling J. Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Campylobacter fetus* in cattle. // *Res Vet Sci*. – 2010. – Vol. 88 (3). – P. 446-451.

9 Brooks BW, Devenish J, Lutze-Wallace CL, Milnes D, Robertson RH, Berlie-Surujballi G. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples // *Vet Microbiol*. – 2004. – Vol. 103 (1-2). – P. 77-84.

10 Wagenaar JA, van Bergen MA, Newell DG, Grogono-Thomas R, Duim B. Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals // *J Clin Microbiol*. – 2001. – Vol. 39 (6). – P. 2283-2286.

11 Willoughby K, Nettleton PF, Quirie M, Maley MA, Foster G, Toszeghy M, Newell DG. A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* – species

venerealis: use on UK isolates of *C.fetus* and other *Campylobacter* spp//J Appl Microbiol. – 2005. – Vol. 99 (4). – P. 758-766.

12 Chaban B, Chu S, Hendrick S, Waldner C, Hill JE. Evaluation of a *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* real-time quantitative polymerase chain reaction for direct analysis of bovine preputial samples // Can J Vet Res. – 2012. 76 (3). – P. 166-173.

13 Gaiping Zhang, Junqing Guo, Xuannian Wang. Immunochromatographic Lateral Flow Strip Tests By // Methods in Molecular Biology. – 2008. – Vol. 504 (11). – P. 169-183.

14 Michel, AL; Simoes, M. Comparative field evaluation of two rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in African buffaloes (*Syncerus caffer*) // Vet. immunology and immunopathology. – 2009. – T.127, V. 1-2. – P.186-189

15 Dykman, LA, Colloidal Gold in Biochemical and Microbiological Investigations. Diss. to the soisk. uch. Art. Doctor of Biol. sciences. – Saratov, 2006. – P. 135

ӘОК 632.2:616.36-005.8:571.27

ІРІ ҚАРА МАЛ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗЫН БАЛАУҒА АРНАЛҒАН ЭКСПРЕСС-ТЕСТТІ ӘЗІРЛЕУ

Боровиков С.Н., Жармышева М.Е.

Түйін сөздер: кампилобактериоз, ірі қара мал, антиденелер, антиген, балау, коллоидты алтын, конъюгат, иммунды хроматография, экспресс-тест.

Түйін

Жүргізілген зерттеулердің нәтижелерінде телімді антиденелер мен коллоидтық алтынды конъюгациялаудың оңтайлы әдістері анықталды. Детекциялау аумағын қалыптастыратын телімді антиденелерді енгізудің оңтайлы оңтайлы параметрлері анықталды: «тесттілеуаумағы» - 0,1 мг/мл, ал бақылау - 5 мкг/мл. Конъюгатты төсемге енгізудің оңтайлы концентрациясы 10 мкг/мл құрады. Тест сезімталдылығының деңгейі 15 нг құрады. Тесттің телімділігі анықталды және реагенттердің өзара әрекеттесуі тек қана *C.fetus* spp. *venerealis* антигенімен байланысатындығы айқындалды. Әзірленген тесттің ПТР және коммерциялық ИХТ тесттерімен салыстырмалды түрде зертханалық сынақтан өткізілді. Зерттеулер барысында зерттеулерге алынған сынамададың ішінен осы ауру қоздырғышы анықталмады. Зертханалық сынақтар әзірленген тесттің тиімділігін дәлелдеді, яғни қосымша жабдықтарды пайдаланбай 15 минут ішінде қоздырғышты анықтауға мүмкіндік береді. Нәтижесінде ірі қара малдың гениталды капилобактериозын балауға арналған иммунды хроматографиялық тест

әзірленді, ол өз кезегінде ветеринария тәжірибесінде қолдануға ұсынылуы мүмкін.

DEVELOPMENT OF EXPRESS TEST FOR DIAGNOSIS OF CAMPILOBACTERIOSIS OF CATTLE

Borovikov S.N., Ph.D., Zharmysheva M.E.

Summary

As a result of the research, the optimal methods for conjugating specific antibodies and colloidal gold were selected. The optimal parameters for the application of antibodies for the formation of detection zones were determined: "test zone" - 0.1 mg / ml, and control - 5 µg / ml. The optimal concentration of conjugate addition to the support is 10 µg / ml. The sensitivity threshold of the test is 15 ng soluble antigen. The specificity of the test was determined, the interaction of the reagents occurs only with respect to the *C. fetus venerealis* antigen. Laboratory tests of the developed test were performed in comparison with the PCR-analysis method and the commercial ICA test. As a result of the study of these samples, in no case the presence of an agent of this infection was identified. Laboratory tests confirm the effectiveness of the developed test, since they can detect the presence of the pathogen within 15 minutes, without the use of additional equipment. As a result, an immunochromatographic test was developed to diagnose genital campylobacteriosis of cattle, which can be recommended for veterinary practice.