

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЭКСПРЕСС-ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Боровиков С.Н., Жумалин А.Х., Джангулова А.

Аннотация

В статье приведены данные по конструированию иммунохроматографического теста для экспресс-обнаружения микобактерий *Mycobacterium bovis* или их антигенов в патологическом материале и других биологических объектах. Отработаны методы конъюгирования моноклональных антител с наночастицами коллоидного золота и изучены их свойства. Определены оптимальные параметры нанесения реагентов на нитроцеллюлозную мембрану. Проведены лабораторные испытания чувствительности и специфичности разработанного ИХА-теста, позволяющие сделать вывод о возможности его использования в ветеринарной практике.

Ключевые слова: туберкулез крупного рогатого скота, моноклональные антитела, экспресс-диагностика, конъюгат, иммунохроматографический анализ

Введение

Распространение инфекционных болезней в Республике Казахстан создает серьезные препятствия для развития животноводства и угрозу здоровью населения. Основной причиной такой ситуации является низкая достоверность используемых методов диагностики. Методы прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота не всегда позволяют установить точный диагноз, а применение бактериологического анализа сопряжено с определенными недостатками: длительность, трудоемкость и опасность заражения персонала [1].

В этой связи особую актуальность приобретают исследования по разработке тестов, характеризующихся простотой и низкой стоимостью, позволяющих быстро и объективно выявлять инфицированных

туберкулезом животных [2]. Известно, что иммунохроматографический анализ (ИХА) в определенной степени отвечает этим требованиям, поскольку позволяет проводить иммунохимические взаимодействия компонентов реакции и детектировать образовавшиеся иммунные комплексы в течение 15-20 минут [3]. Как правило, для создания таких тестов используют моноклональные антитела, обладающие высокой специфичностью к антигенам возбудителя [4]. В настоящее время зарубежными учеными предпринимаются попытки создания ИХА для прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [5].

В этой связи, нами была поставлена задача создания теста для обнаружения возбудителя туберкулеза (*Mycobacterium bovis*) или его

антигенов, сочетающих высокую чувствительность и быстроту получения результатов.

Материалы и методика исследований

В работе использованы полученные ранее в НИИ сельскохозяйственной биотехнологии моноклональные антитела к белковому антигену клеточной стенки *M. bovis* (штамм - продуцент *Mab/Mb 8*, № С-РКМ 0214) [6].

Поликлональные антитела к антигенам возбудителя туберкулеза бычьего типа [7] и коммерческие антитела против *Ig* мыши (*Sigma-Aldrich*, США). Для изготовления конъюгированных препаратов использовали коллоидное золото (*Sigma-Aldrich*, США).

При конструировании ИХА-теста использовали нитроцеллюлозные мембраны типов *CNPF* (5μ, 8μ, 10μ и 15μ), стекловолоконные мембраны для нанесения конъюгата (*TYPE-PT-R5*) и адсорбирующие мембраны (*TYPE-AP-045*) производства «*Advanced Microdevices*» (Индия).

Для проверки специфичности теста использовали инактивированные штаммы микроорганизмов, любезно предоставленные сотрудниками ТОО «Казахский Научно-исследовательский ветеринарный институт», г. Алматы.

Методика определения концентрации белка, для конъюгирования с коллоидным золотом (КЗ). На полистироловом планшете выбирали 8 рядов, в каждом из которых по 6 лунок. Каждый ряд соответствовал фиксированному значению рН, а каждый столбец – определенной концентрации антител. Доводили рН

коллоидного золота до значений от 6 до 10. В лунки планшета вносили по 200 мкл КЗ с соответствующими значениями рН и по 20 мкл антител с концентрациями от 10 до 120 мкг/мл. Реакционную смесь перемешивали, добавляли по 0,1 мл 10%-го раствора хлорида натрия. Измеряли оптическое поглощение в лунках и определяли зависимость от концентрации антител [8].

Приготовление конъюгата. Методика №1. Антитела диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ трис-*HCl* буфера, рН 8,5, в течение 2 ч при 4°C. К 100 мкл раствора антител добавили по 1 мл раствора коллоидных частиц, перемешивали и инкубировали 10 мин. Добавляли по 100 мкл 10 %-ного *NaCl*. К раствору КЗ добавляли 0.2 М *K₂CO₃* до достижения рН 8.5 и вносили в раствор антител. Через 30 мин вносили бычий сывороточный альбумин (БСА) до концентрации 0.25 %. Конъюгат центрифугировали (8000 g 30 мин), осадок ресуспендировали в ФСБ, рН 7,4.

Методика №2: рН раствора КЗ доводили до 8,5 и последовательно добавляли растворы антител и БСА в 10 мМ трис-буфере, рН 8,5 и инкубировали 15 мин. Очищали конъюгат центрифугированием при 15000 g, а осадок ресуспендировали в 1 мл 10 мМ трис-буфере.

Методика №3. К коллоидному золоту добавляли раствор антител (рН от 7,5 до 10,0), инкубировали при 20°C и стабилизировали раствором БСА. Центрифугировали, осадок растворяли в 50 мМ К-фосфатном буфере, рН 7,4, с 0,1 М *NaCl*, содержащем 0,25% БСА и 0,25% Твин 20.

Методика № 4. К 10 мл раствора КЗ с рН 7,0–7,5 добавляли 1 мл раствора антител, инкубировали 30 мин. Добавляли БСА до концентрации 0,1%, сахарозу 10% и 0,01% азида натрия, центрифугировали (30 мин, 11000g, 4°C). Осадок растворяли в буфере с 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азида натрия [9].

Дот-анализ выполняли на нитроцеллюлозных мембранах (НЦМ) с диаметром пор 0,2 мкм. На мембраны точно (в количестве 1 мкл) наносили исходный антиген, который предварительно титровали. Для блокирования сайтов неспецифической адсорбции, мембраны выдерживали 1 час при 37°C в блокирующем буфере - *Blocking buffer* 1x (*Sigma*, США). Промывали 3 раза в фосфатно-солевом буфере с Твином-20. Затем, тест-полоски 15 минут инкубировали в растворе конъюгата. Результаты реакции учитывали визуально, положительная реакция характеризуется появлением точек в местах нанесения антигена [10].

Изготовление иммунохроматографического композита. Конъюгаты в объеме 10 мкл наносили на стекловолоконистые мембраны. Для формирования аналитической и контрольной зоны на мембрану с помощью автоматического диспенсера наносили раствор специфических антител и на расстоянии 5 мм раствор антивидовых антител. Мембраны высушивали при комнатной температуре и склеивали. Полученные поликомпозиционные листы нарезали на тест-полоски с помощью аппарата *Programmable Strip Cutter* (Индия) [11].

Для проведения иммунохроматографического анализа на подложку для внесения образца пипеткой вносили исследуемую пробу, тест-полоски помещали на горизонтальную поверхность при комнатной температуре. Через 15 мин учитывали результат. В случае образования двух полосок на мембране - результат считали положительным, в случае образования одной - отрицательным.

Основные результаты исследований НИР

В результате использования различных методик конъюгирования МКА (исходная концентрация - 4 мг/мл) с коллоидным золотом, получено 4 вида конъюгированных препаратов.

Дальнейшая работа заключалась в проверке рабочих свойств конъюгатов. Иммуноактивность конъюгатов проверяли методом *dot*-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране. Конъюгат, приготовленный по методике № 4 показал наиболее высокую активность по отношению к антигену. Это позволяет использовать данную методику для получения конъюгатов, необходимых при конструировании ИХА-теста.

Следующей задачей являлся подбор оптимальной концентрации конъюгата, наносимого на подложку (мембрану для конъюгата), с этой целью были использованы разные концентрации конъюгата. При этом установлено, что взаимодействие антител, конъюгированных с коллоидным золотом и антител, иммобилизованных в тест - и контрольной зонах, происходит

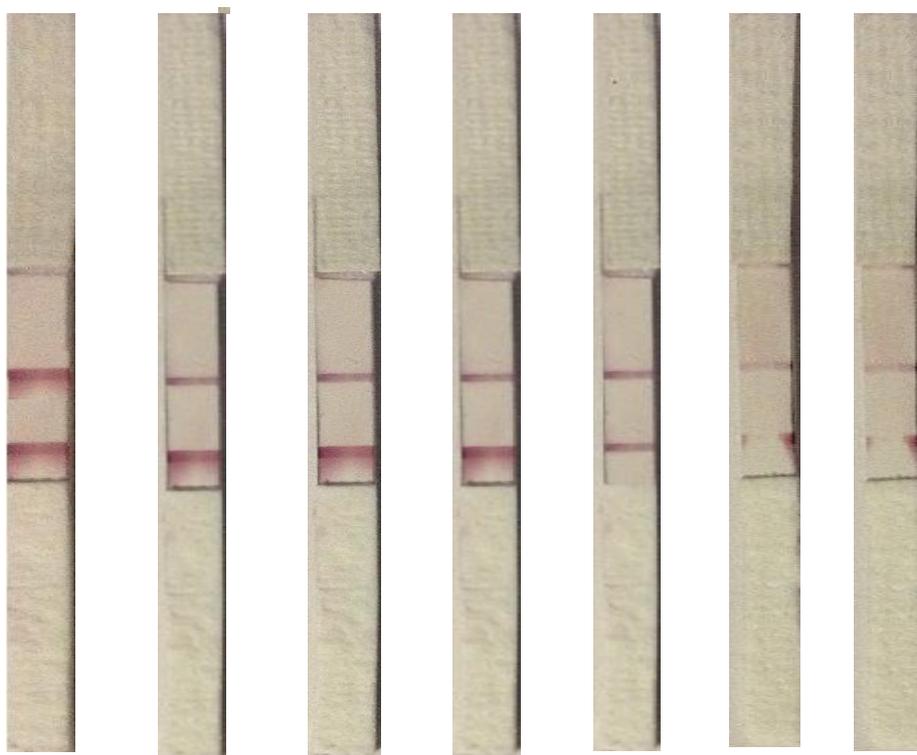
наиболее эффективно при концентрации конъюгата 10 мкг/мл.

Далее определяли оптимальный объем нанесения конъюгата на «подложку», для этого на мембрану наносили раствор в объемах от 5 до 20 мкл. По итогам исследований выяснили, что оптимальным объемом внесения конъюгата является 9 мкл/мм, который обеспечивает равномерную

Результаты представлены на рисунке 1.

пропитку мембраны и гарантирует отсутствие избытка реагента.

На следующем этапе определяли оптимальные параметры нанесения на мембрану поликлональных антител к антигенам возбудителя туберкулеза и коммерческих антивидовых антител против *Ig* мыши. Растворы антител с различной концентрацией наносили на НЦМ с помощью программируемого аппарата.



а б в г д е ж

Примечания:

- а - концентрация ПКА – 4 мг/мл, концентрация антивидовых антител 60 мкг/мл;
- б - концентрация ПКА – 3 мг/мл, концентрация антивидовых антител 30 мкг/мл;
- в - концентрация ПКА – 2 мг/мл, концентрация антивидовых антител 15 мкг/мл;
- г - концентрация ПКА – 1 мг/мл, концентрация антивидовых антител 7,5 мкг/мл;
- д - концентрация ПКА – 0,5 мг/мл, концентрация антивидовых антител 5 мкг/мл;
- е - концентрация ПКА – 0,25 мг/мл, концентрация антивидовых антител 3 мкг/мл;
- ж - концентрация ПКА – 0,1 мг/мл, концентрация антивидовых антител 2 мкг/мл

Рисунок 1 – Оптимизация концентрации внесения антител

Из рисунка 1 видно, что хорошая воспроизводимость результата

отмечена при концентрации поликлональных антител (ПКА) – от 3 до

1 мг/мл. В случае с антивидовыми антителами, присутствие фонового сигнала заметно при концентрации от 7,5 до 60 мкг/мл. Из результатов опыта следует, что оптимальная концентрация нанесения антивидовых антител против *Ig* мыши на рабочую поверхность НЦМ составляет 5 мкг/мл, а концентрация ПКА составляет 1 мг/мл.

На следующем этапе проводили сборку мембран. На одну сторону НЦМ наклеивали стекловолоконную крупнопористую мембрану с уже нанесенным конъюгатом, а сверху размещали мембрану под образец. На другую сторону наклеивали адсорбирующую мембрану. На мембрану наносили раствор ПКА для формирования аналитической зоны, на расстоянии 5 мм наносили раствор *Antimouse IgG* с концентрацией 1 мг/мл. Полученные поликомпозиционные листы высушивали при комнатной температуре 12 часов и нарезали на тест-полоски.

После определения оптимальных условий и параметров сборки ИХА-теста, изучали рабочие свойства. Готовили заведомо известную концентрацию туберкулезного антигена (концентрация от 1мг/мл до 1мкг/мл). Пипеткой наносили пробы антигена на подложку и оставляли при комнатной температуре. При нанесении образца, содержащего ан-

тигены, происходит их связывание с МКА конъюгата. Иммуновый комплекс под действием капиллярных сил попадает в тестовую зону, образуя комплекс: антитела-антиген-антитела+метка. Избыток конъюгата связывается с антивидовыми антителами на контрольной линии. В случаях нанесения образцов, содержащих антигены, обнаруживалось появление 2-х линий на полоске, что является положительным результатом. При отсутствии антигена - конъюгат связывается с антивидовыми антителами в контрольной зоне, образуя одну линию, это отрицательный результат.

Для определения чувствительности теста использовали пробы, содержащие антиген *M. bovis* в концентрации от 500 мкг/мл до 1 нг/мл. После внесения пробы из каждого разведения, через 15 минут оценивали результат. Во избежание ошибок, опыт проводили в 3-х повторях. В результате установили, что порог чувствительности теста составляет 10-20 нг антигена.

Специфичность теста определяли путем использования антигенов гомологичных и гетерологичных микроорганизмов. Для этого готовили заведомо известную концентрацию бактериальных антигенов. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты определения специфичности тест-системы для выявления *M. bovis* или их антигенов

Антигены	Минимальная концентрация выявляемых антигенов, мкг/мл
Ультразвуковой дезинтегратор <i>M. bovis</i> шт.8	0,02
ППД - туберкулин для млекопитающих	0,5

(ТОО «Вита-СТ», РК, серия 02)	
Единый бруцеллезный антиген (НПП «Антиген», РК, серия 03)	PO
<i>Brucella abortus</i> шт.19	PO
<i>Salmonella dublin</i>	PO
<i>Y. enterocolitica</i>	PO
<i>M. phlei</i>	PO
<i>M. terrae</i>	PO
<i>M. kansasii</i>	PO
<i>M. avium</i>	1000

В результате установлено, что диагностикум реагировал в отношении гомологичных антигенов (*M. bovis* шт.8 и ППД - туберкулину для млекопитающих), при этом минимальная концентрация в первом случае была равна 20 нг, а во втором – 500 мкг/мл. Также, положительная реакция зафиксирована в отношении одного вида атипичных микобактерий (*M. avium*), однако в гораздо большей концентрации (1000мкг/мл). В остальных случаях был получен отрицательный результат.

Обсуждение полученных данных и заключение

В результате конъюгирования МКА с коллоидным золотом, с использованием различных методик, получено 4 вида конъюгированных препаратов. При проверке рабочих свойств полученных конъюгатов методом *dot*-иммуноанализа наиболее высокую активность показал конъюгат, приготовленный по методике № 4.

При подборе оптимальной концентрации конъюгата наносимого на подложку, установлено, что взаимодействие конъюгированных антител, и антител, иммобилизованных в тест - и контрольной зоне, происходит наиболее эффективно при концентрации 10 мкг/мл. Концентрация конъюгата 5 мкг/мл и ниже не позволяла формировать контрольную и тестовую зоны. А при концентрации конъюгата более 10 мкг/мл происходит образование фонового сигнала.

Для оптимизации объема конъюгата, наносимого на подложку, использовали от 5 до 20 мкл конъюгата. Исходя из опыта установили, что оптимальный объем внесения конъюгата - 9 мкл/мм, который обеспечивает равномерную пропитку мембраны и отсутствие избытка реагента.

При конструировании теста решающую роль играют зоны детекции, формируемые из поликлональных и антивидовых антител. Раство-

ры антител с различной концентрацией наносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью программируемого аппарата. Лучшие результаты получены при концентрации ПКА – от 3 до 1 мг/мл. При меньших концентрациях чувствительность анализа заметно снижается, так как линии плохо окрашиваются. В случае с антивидовыми антителами, присутствие фонового сигнала заметно при концентрации от 7,5 до 60 мкг/мл. Оптимальным вариантом, при котором визуально обнаруживается ярко-окрашенная полоса является концентрация 5 мкг/мл. При более низких концентрациях полоса на месте взаимодействия конъюгата с антителами становится нечеткой. Из результатов опыта следует, что оптимальная концентрация нанесения антивидовых антител против Ig мыши на рабочую поверхность нитроцеллюлозной мембраны составляет 5 мкг/мл, а концентрация ПКА составляет 1 мг/мл. Внесение антител с концентрацией выше указанного уровня приводит к увеличению несорбированных на поверхности молекул иммуноглобулинов и появлению нежелательного фонового сигнала. Использование более низкой концентрации недостаточно для специфического взаимодействия антител и антигена, вследствие чего снижается чувствительность теста.

Основными критериями современных диагностических препаратов являются такие показатели как чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов. Поэтому, следующей задачей являлось проведение лабораторных испыта-

ний чувствительности и специфичности разработанного теста.

Поликомпозитные листы с нанесенными иммунореагентами нарезали на тест-полоски, в результате получали укомплектованный ИХА-тест для выявления микобактерий *M. bovis* или их антигенов в патологическом материале и других биологических объектах. Опытным путем установили, что порог чувствительности теста составляет 10-20 нг, что сопоставимо с чувствительностью аналогичных иммунологических методов, в частности различных вариантов ИФА.

Специфичность теста определяли путем использования антигенов гомологичных и гетерологичных микроорганизмов. В результате установлено, что диагностикум реагировал в отношении гомологичных антигенов (*M. bovis* шт.8 и ППД - туберкулину для млекопитающих), при этом минимальная концентрация *M. bovis* была равна 20 нг, а ППД – туберкулина – 500 мкг/мл. Кроме того, положительная реакция зафиксирована в отношении одного вида атипичных микобактерий (*M. avium*), однако в гораздо большей концентрации (1000 мкг/мл). В остальных случаях был получен отрицательный результат.

Исключительно высокую специфичность теста обеспечивают используемые МКА, строго специфичные к антигенам микобактерий вида *M. bovis*, которые вызывают заболевание у крупного рогатого скота.

В ходе исследований отработаны методы получения конъюгатов коллоидного золота и иммуноглобулинов, получено препаративное количество конъюгатов и определены

их рабочие свойства. Осуществлен подбор оптимальной концентрации внесения конъюгата (МКА+КЗ) на подложку для образцов, режимы иммобилизации ПКА к исследуемому антигену в область тест-зоны и антивидовых антител, жестко иммобилизованных в контрольной зоне.

Проведены лабораторные испытания чувствительности и специфичности разработанного ИХА-теста для выявления микобактерий *M.bovis* или их антигенов в патологическом материале и других биологических объектах, которые показали высокую чувствительность и специфичность теста. Полученные положительные результаты позволяют проводить дальнейшую работу по совершенствованию теста и испытанию его в производственных условиях.

В результате сконструирован ИХА-тест, представляющий собой набор компонентов, состоящий из тест-полоски с адсорбированными реагентами, который предназначен для экспресс-обнаружения возбудителя туберкулеза в биологических объектах. В нашем варианте ИХА используется конъюгат (МКА+КЗ), нанесенный на мембрану. На тестовой линии иммобилизованы ПКА, специфические к антигенам возбудителя туберкулеза, а на контрольной линии – антивидовые антитела

против Ig мыши. При нанесении образца, содержащего антигены туберкулеза и попадании его на мембрану с конъюгатом, происходит связывание антигена с конъюгатом Ат-метка. Затем иммунный комплекс попадает в тестовую зону, где он связывается со специфическими антителами, образуя «сэндвич» антитела-антиген-антитела+метка. Избыток несвязавшегося конъюгата связывается с антивидовыми антителами на контрольной линии. Таким образом, выявление 2-х линий на тест-полоске является положительным результатом теста. При отсутствии антигена туберкулеза в исследуемом образце конъюгат связывается с антивидовыми антителами только на контрольной линии, образуя одну линию.

Таким образом, разработан иммунохроматографический тест для обнаружения возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота, позволяющий получать результат в течение 15-20 минут. Достоинством теста является возможность проведения анализа вне лабораторий, без использования оборудования и дополнительного обучения специалистов.

P.S. Работа выполнена при поддержке гранта Национального агентства по технологическому развитию Республики Казахстан.

Список литературы

1. Тургенбаев К.А. Диагностика туберкулеза животных. - Алматы, 2001. - С. 15-24
2. Сураншиев Ж.А., Акибеков О.С., Куйбагаров М.А., Боровиков С.Н. Принципы конструирования диагностических тестов на основе моноклональных антител //Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы иннова-

ционного развития. Матер. научно-практ. конф. посвященной 50-летию НИИ проблем биологической безопасности. Алматы, 2008. - С.406-408.

3. Byzova N. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V. Eremin S. A., Dzantiev V. B. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk // *Talanta*. – 2010. – № 3. – С. 843-848.

4. Hu, XM; Cheng, SL; Liu, XF; Li, J; Zheng, W ; Lu, G; Zhang, J ; Zheng, J; Zhang, J Development of monoclonal antibodies and immunochromatographic lateral flow device for rapid test of alanine aminotransferase isoenzyme 1 // *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION*.- 2016. Т.119.- С. 94-101

5. 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.Т.127, V. 1-2. - С. 186-189

6. Сураншиев, Ж.А. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus L.* – используемый для получения моноклональных антител к *Mycobacterium bovis*. / Сураншиев Ж.А., Акибеков О.С., Булашев А.К., Боровиков С.Н., Шенжанов К.Т., Куйбагаров М.А.// Патент КЗ на изобретение № 24164 от 22.04.2011 г., бюллетень №6.

7. Сұраншиев Ж.Ә., Әкібеков Ө.С., Боровиков С.Н.. *Mycobacterium bovis* антиген-деріне қарсы моноклональды антиденелер түзетін гибридома жасушаларын алу //Жаршы. Ғылыми-теориялық және практикалық журнал. «Бастау» ЖШС, Алматы, 2007. №9 (176). –Б. 46-49.

8. Hermanson G. T. Bioconjugate techniques // Amsterdam: AcademicPress. - 2008.– С.1202.

9. Дыкман Л. А. Коллоидное золото в биохимических и микробиологических исследованиях// Диссерт. на соиск. уч. ст. доктора биол. наук. – Саратов, 2006. – С. 135

10. Урусов А. Е., Жердев А. Изучение зависимости аналитических параметров иммунохроматографических тест-систем от режима иммобилизации иммунореагентов на мембраны. Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3. [Электрон. ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=9406> (дата обращения: 02.03.2016).

11. Урусов А. Е. Разработка и сравнительная характеристика систем экспрессного иммунохимического определения микотоксинов // Автореферат диссер. на соиск.уч. ст. к.х.н.: - М. – 2012. – С.4.

Түйін

Моноклональды антиденелермен коллоидты алтын нанобөлшектерін конъюгациялау әдістері оңтайландырылды және оның қасиеттері анықталды. Патологиялық материалдан немесе биологиялық нысандардан *M.bovis* микобактериаларын немесе олардың антигендерін анықтау үшін иммунды хроматографиялық тестті құрастырудың қолайлы параметрлері анықталды. Өзірленген ИХА-тесттің сезімталдылығымен телімділігі зертханалық сынақтан

өткізілді, соның нәтижесінде тестті ветеринарлық тәжірибеде қолдануға болады деп айтуға болады.

Summary

Methods of the conjugation of monoclonal antibodies with nano particles of colloidal gold are worked and their properties are studied. Optimum parameters of designing of Immunoassay test for identifications of *M. bovis* or their antigenes in pathological material and other biological objects are determined. The laboratory researches of sensitivity and specificity of developed Immunoassay test allowing to draw a conclusion on a possibility of its use in veterinary practice are carried out.