

«Сейфуллин окулары–12: Ғылым жолындағы жастар - болашақтың инновациялық элеуеті" атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения–12: Молодежь в науке-инновационный потенциал будущего». – 2016. – Т.І, ч.1. – С. 255-257

ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОАКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ АНТИГЕНА *CAMPYLOBACTER FETUS* И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

Боровиков С.Н., Жармышова М.Е.

Кампилобактериоз – инфекционная болезнь, вызываемая патогенными микроорганизмами рода *Campylobacter*. *Campylobacter fetus* вызывает генитальный кампилобактериоз крупного рогатого скота (вибриоз), который наносит большой экономический ущерб связанный с абортами, выбраковкой животных, наложением ограничительных мероприятий, ликвидацией молока, затраты на ветеринарные препараты и дезинфекцию. В племенных хозяйствах уничтожают все семя от зараженных производителей. Во многих странах отмечается высокий уровень инфицирования крупного рогатого скота [1, 2, 3]. Основным источником возбудителя кампилобактериоза служат быки-производители. Распространение возбудителя осуществляется через корм, подстилку, воду, продукцию животноводства. Но также он представляет большую эпидемиологическую опасность [4]. Для диагностики кампилобактериоза в ветлабораториях РК используют бактериологические, биологические и серологические методы. Основным методом является бактериологический, только выделение возбудителя дает право устанавливать диагноз на кампилобактериоз. Согласно руководства МЭБ, идентификация самого возбудителя является основным предписывающим тестом. Однако, бактериологическая диагностика кампилобактериоза очень трудоемка, для роста кампилобактерий требуются условия с повышенным содержанием углекислого газа и приобретение дорогостоящих селективных сред.

Кроме того, 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 [5,6,7]. Однако, применение ПЦР в ветлабораториях затруднительно, из-за высокой стоимости оборудования и высокой цены тест-систем (праймеров).

В этой связи, весьма актуальным является проведение исследований по разработке экспресс-теста для выявления и одновременной дифференциации возбудителя кампилобактериоза, за счет использования моноклональных антител (МКА) к антигенным детерминантам возбудителя. Первым шагом при разработке такого теста является получение высокоспецифического антигена, который будет использован для иммунизации лабораторных

животных с целью получения поликлональных и моноклональных антител к эпитопам антигена.

Работа по культивированию выделенной культуры *Campylobacter fetus venerealis* и наработке бактериальной массы микроорганизмов была проведена на базе РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» Комитета ветеринарного контроля и надзора МСХ РК.

Из предоставленного биологического материала получали белковый антиген с помощью метода ультразвуковой дезинтеграции. Ультразвуковой дезинтеграт был получен из клеток кампилобактерий путем воздействия на бактериальные взвеси ультразвуковых волн частотой 22 кГц и интенсивностью 100 Вт/см^2 , на дезинтеграторе U-2 (Чехословакия) в течение 60 мин. Бактериальную взвесь перед разрушением замораживали 20 минут при -70°C , растирали пестиком до водянистой однородной массы. Эту процедуру повторяли несколько раз. Затем добавляли 10 мл раствора NaOH с 1% SDS. Дезинтеграцию осуществляли при визуальном контроле (до слабого просветления) в течение 30 минут. После этого взвесь центрифугировали при 3500 об/мин 20 мин, для дальнейших исследований отбирали супернатант.

Содержание белка определяли по методу Бредфорд. Опытные и контрольные пробы белка раститровывали в объеме 50 мкл. В каждую лунку вносили по 50 мкл реактива Бредфорда и учитывали результат на спектрофотометре при длине волны 492 нм. В надсадочной жидкости разрушенной ультразвуком бакмассы, содержание белков составило 0,5 мг/мл.

Очередным этапом работы явилось изучение структуры и состава полученного антигена *Campylobacter fetus* путем проведения электрофоретического анализа. Известно, что метод электрофоретического разделения широко применяют как для анализа компонентов смеси белков, так и для получения гомогенного белка. В нашем случае необходимо было установить наличие и количество белковых фракций в составе данного образца антигена. Электрофорез проводили в 12 % -ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по методу *J. Laemmli et al.* [8] на аппарате для вертикального электрофореза *Compact dual minicode* (Англия).

Исследуемый образец антигенов предварительно разводили в фосфатно-солевом буфере (1×PBS). Далее пробы разводили буфером для разведения образцов в соотношении 1:1, кипятили на водяной бане в течение 3-5 минут и охлаждали. Для определения молекулярного веса белковых фракций, содержащихся в исследуемом образце, использовали маркер фирмы *Sigma*. Электрофорез проводили при силе тока 45 мА и напряжении 120V .

По завершении процесса гель вынимали из пластин, окрашивали в течение 1 часа и отмывали до полного исчезновения фоновой окраски. В результате электрофоретического анализа было установлено, что антиген разделится на 3 основные белковые фракции с молекулярной массой около 27 кДа, 45 кДа и 70 кДа.

Для установления иммуногенности полученных фракций была проведена постановка иммуноблотинга, предусматривающая следующие этапы: проведение электрофореза; перенос электрофореграммы на нитроцеллюлозную мембрану; иммунохимическое проявление нитроцеллюлозных реплик.

Для иммунохимического проявления специфических антигенов нитроцеллюлозную мембрану сначала инкубировали в 1 % растворе БСА в течение ночи при 4 С. Затем отмывали по три раза ЗФР и ЗФР-Тв и выдерживали 1,5 ч при 37⁰ С в контрольной положительной сыворотке, в разведении 1:10. Носитель вновь отмывали и инкубировали в рабочем разведении антивидовых антител, меченых пероксидазой хрена (1ч при 37⁰ С). Повторяли процедуру отмывки и проявляли реакцию по расщеплению субстрата. В результате иммуноблотинга установлено, что две белковые фракции (с молекулярной массой 27 и 45 кДа) достаточно активно взаимодействовали с положительной сывороткой.

Таким образом, с помощью электрофореза было установлено наличие в составе полученного антигена 3-х основных белковых фракции, а в иммуноблотинге (*Western blot*) установлены 2 специфические белковые фракции антигена, активно взаимодействующие с положительными сыворотками.

Список литературы

1. 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 May 19;93(2):121-32.
2. Sadkowska-Todys M, Kucharczyk B. *Campylobacteriosis* in Poland in 2012. *Przegl Epidemiol.* 2014;68(2):239-41.
3. 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 Dec 5;55:87.
4. Sanad YM, Kassem II, Abley M, Gebreyes W, LeJeune JT, Rajashekara G. Genotypic and phenotypic properties of cattle-associated *Campylobacter* and their implications to public health in the USA. *PLoS One.* 2011;6(10):e25778.
5. 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 Jun;39(6):2283-6.
6. 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;99(4):758-66.

7. 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 Jul;76(3):166-73.

8. Laemmli V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. - Vol. 227. - P. 680-685.