

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.6. - С.133-136

ИЗГОТОВЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ТЕСТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

***Боровиков С.Н., Кудайбергенова Э.Б.,
Ташмагамбет Ж.А.***

Генитальный кампилобактериоз крупного рогатого скота (вibriоз), вызывает возбудитель *Campylobacter fetus*, при этом высокий уровень инфицирования животных отмечается во многих странах [1, 2]. Болезнь наносит хозяйствам большой экономический ущерб, связанный с абортами, выбраковкой животных, наложением ограничительных мероприятий, ликвидацией молока, затраты на ветеринарные препараты и дезинфекцию. Для диагностики кампилобактериоза в ветеринарных лабораториях РК используют бактериологические, биологические и серологические методы. Основным методом является бактериологический, однако, бактериологическая диагностика кампилобактериоза очень трудоемка, для выращивания кампилобактерий требуется наличие специального оборудования и дорогостоящих селективных сред.

В настоящее время, для выявления и дифференциации кампилобактерий используются современные методы: ПЦР-анализ и ПЦР-анализ с детекцией в режиме реального времени, позволяющие проводить одновременное выявление и дифференциацию *Campylobacter fetus* от других видов кампилобактерий [3, 4]. Однако, применение ПЦР может осуществляться исключительно в хорошо оснащенных ветеринарных лабораториях, а также сдерживающим фактором является высокая цена тест-систем (праймеров).

С учетом вышеизложенного, нами поставлена задача проведения исследований по разработке экспресс-теста для выявления возбудителя кампилобактериоза без использования дорогостоящего оборудования. Иммунохроматографический анализ (ИХА) позволяет проводить иммунохимические взаимодействия компонентов реакции и детектировать образовавшиеся иммунные комплексы в течение 15-20 минут [5]. Для создания таких тестов необходимо изготовление нескольких компонентов, основным из которых является конъюгат (специфические иммуноглобулины, меченые коллоидным золотом), обладающий высокой специфичностью к антигенам возбудителя.

Материалы и методика исследований. В работе использованы полученные ранее поликлональные антитела к антигенам возбудителя *Campylobacter fetus* и коммерческие антитела *Antimouse Ig G*.

Золотохлористоводородная кислота (Gold (III) chloride hydrate), вещество, используемое для получения коллоидного золота (*Sigma-Aldrich*, США).

Растворы коллоидного золота (КЗ) с заданным размером частиц (20 нм) получали по методам [6, 7]. Для этого 0,01% водный раствор золотохлористоводородной кислоты ($\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) 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 4-6 °С.

Определение концентраций белков, оптимальной для иммобилизации на коллоидном золоте проводили на 96-луночном полистироловом планшете («Greiner», Австрия). На планшете выбирали 8 рядов, в каждом из которых было по 6 лунок. Каждый ряд соответствовал фиксированному значению рН, а каждый столбец – определенной концентрации антител [8].

В аликвотах (по 2,5 мл) суспензии коллоидного золота доводили рН до значений в диапазоне от 6 до 10 с шагом 0,5, добавляя 0,1 М 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 0, 10, 20, 40, 80, 120 мкг/мл в деионизованной воде. Реакционную смесь перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 мин, затем добавляли по 0,1 мл 10%-го раствора хлорида натрия. 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 иммуноглобулинами проводили с использованием нескольких методик [9, 10].

Методика №1. Иммуноглобулины диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ трис-НСl буфера, рН 8,5, в течение 2 ч при 4 °С. К 100 мкл растворов 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 бычий сывороточный альбумин (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 (ФБС), рН 7,4, содержащем 0,25% БСА. При необходимости длительного хранения к полученному продукту добавляли азид натрия до конечной концентрации 0,01%.

Методика №2. Раствор коллоидного золота доводили 0,2 М K_2CO_3 до рН 8,5, после чего последовательно добавляли растворы антител и БСА в 10 мМ трис-буфере, рН 8,5. После инкубации в течение 15 мин проводили очистку полученного конъюгата от неадсорбированных антител трехкратным центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин.

Методика №3. Для получения конъюгата антитела переводили в 10 мМ буфер со значением pH от 7,5 до 10,0. К коллоидному золоту добавляли раствор антител, инкубировали при комнатной температуре и дополнительно стабилизировали раствором бычьего сывороточного альбумина. Коллоидное золото с иммобилизованными молекулами IgG отделяли от несвязавшихся молекул антител центрифугированием. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,4, с 0,1 М NaCl (ФСБ), содержащем 0,25% БСА и 0,25% Твин 20.

Методика № 4. К 10 мл раствора коллоидного золота с pH 7,0-7,5 добавляли по каплям при перемешивании 1 мл раствора антител с выбранной концентрацией, перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем к полученному раствору добавляли БСА до конечной концентрации 0,1%, сахарозу до конечной концентрации 10%, а также 0,01% азида натрия. Для удаления несвязавшихся антител конъюгат центрифугировали (30 мин, 11000 g, 4°C). Супернатант удаляли, осадок перерастворяли в требуемом объеме фосфатном буфере, содержащем 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азида натрия. Смесь хранили при температуре +4°C.

Постановка dot-иммуноанализа. В первый ряд 96-луночного планшета вносили 50 мкл антигена и титровали в 50 мкл ФСБ. Во второй ряд также титровали отрицательный контроль. Проведение анализа 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 блокирующем буфере – *Blocking buffer* 10x. Промывали 3 раза в ФСБ с Твином-20. Для обнаружения антигена нитроцеллюлозные полоски после вышеуказанной обработки инкубировали в растворе конъюгата коллоидного золота и поликлональных антител 15 минут.

Основные результаты исследований. Изучение оптимальных параметров получения конъюгированных препаратов на основе МКА и коллоидного золота проводили следующим образом. Для визуализации взаимодействия мы использовали наночастицы золота, которые обладают способностью поглощать свет в видимой области спектра. Частицы коллоидного золота были получены путем восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. При этом соблюдалась определенная пропорция добавления реагентов, с целью получить коллоидные частицы золота диаметром около 20 нм. В процессе приготовления коллоидного золота цвет менялся от бесцветного до фиолетового, а затем стал винно-красным. В результате были получены наночастицы коллоидного золота диаметром около 20 нм, pH 6,5. Для создания тест-систем немаловажную роль играет конъюгат золота и антител. От качества данного конъюгата зависит интенсивность окраски линии, взаимодействие с антителами и антигеном и т.д. Поэтому для приготовления наиболее качественного конъюгата следует подобрать оптимальные условия

для того, чтобы получить стабильно меченные золотом антитела, которые эффективно взаимодействуют с тропонинами.

Для определения минимальной стабилизирующей концентрации антител и рН сорбции коллоидного золота проводили перекрестное титрование на 96-луночном планшете. Готовили растворы коллоидного золота с разным значением рН и к данным растворам добавляли антитела с концентрациями – 0, 10, 20, 40, 80, 120 мкг/мл. При увеличении ионной силы, путем добавления хлорида натрия, наблюдалось изменение цвета растворов до синего в связи с агрегацией нестабилизированных частиц золота. В процессе исследований установлено что, оптимальной стабилизирующей концентрацией антител является 15 мкг/мл и рН 7,5.

Дальнейшая работа заключалась в проверке рабочих свойств полученных нами конъюгатов. Иммуноактивность конъюгатов проверяли методом *Dot*-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране. На полоски нитроцеллюлозной мембраны наносили специфический антиген, который предварительно титровали в планшете с ФСБ, начиная с разведения 1:2, и наносили точно, в количестве 1 мкл. Для блокирования сайтов неспецифической адсорбции, мембраны выдерживали 1 час при 37°C в блокирующем буфере - *Blocking buffer* 1x (*Sigma*). 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 убывающей интенсивности в местах нанесения антигена. По данной методике были испытаны конъюгаты, полученные с использованием различных методов. В результате конъюгирования антител с коллоидным золотом, получено 4 вида конъюгированных препаратов.

Яркие, четко выделяющиеся точки розового цвета в местах взаимодействия конъюгата и специфического антигена были получены при использовании конъюгатов, полученных по методам №1 и №4. Однако, как показали сравнительные исследования, конъюгат, приготовленный по методике № 4 показал наиболее высокую активность по отношению к антигену, титр при этом составил – 1:16. Это позволяет использовать данную методику получения конъюгатов, необходимых при конструировании ИХА-теста для выявления возбудителя кампилобактериоза крупного рогатого скота.

Таким образом, отработаны методы получения конъюгатов коллоидного золота и иммуноглобулинов, получено препаративное количество конъюгатов и определены их рабочие свойства. Полученные конъюгаты будут использованы при конструировании иммунохроматографического теста для диагностики кампилобактериоза крупного рогатого скота, позволяющего получать результат в течение 15-20 минут, без использования оборудования и дополнительного обучения специалистов.

Список литературы

1. [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.

2. Schmidt T., Venter E. H., Picard J. A. Evaluation of PCR assays for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings and the identification of subspecies in South African field isolates // *Journal of the South African Veterinary Association*. – 2010. – Vol. 81. – P. 87-92.

3. Шевцов А.Б., Карибаев Т.Б., Каиржанова А.Д., Джаилбекова А.С. и др. Разработка ПЦР с детекцией в агарозном геле для выявления кампилобактерий / *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина*. – 2013. – №4(79). – С. 27-36.

4. [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.

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

6. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Phys. Sci.* – 1973. – №241. – С. 20-22.

7. Дыкман Л. А. Коллоидное золото в биохимических и микробиологических исследованиях // *Дисс. на соиск. уч. ст. докт. биол. наук*. – Саратов, 2006. – С. 135.

8. Hermanson G. T. *Bioconjugate techniques* // Amsterdam: Academic Press. – 2008. – С. 1202.

9. 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).

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

