

«Сейфуллин окулары-14: Жастар, ғылым, инновациялар: цифрландыру – жаңа даму кезеңі» атты Республикалық ғылыми-теориялық = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения-14: Молодежь, наука, инновации: цифровизация – новый этап развития». - 2018. – Т.1, Ч.2. - С. 308-310.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Боровиков С.Н., к.б.н., доцент
Нурмагамбетова А.С., магистрант*

Во многих странах отмечается высокий уровень инфицирования крупного рогатого скота кампилобактериозом [1,2]. 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. В результате исследований, показано, что в неблагополучных стадах возбудитель может передаваться от одного животного к другому, при совместном их содержании [3].

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. Значительный экономический ущерб при кампилобактериозе в скотоводстве складывается за счет абортов, перегулов у коров, снижения молочной продуктивности, затрат на проведение противоэпизоотических мероприятий. Кроме этого животноводство несет убытки от заболеваемости и падежа молодняка. В популяциях коров, где кампилобактериоз устанавливается впервые, абортирует до 60% животных. 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 [4].

Кампилобактериоз относится к зооантропонозам. Заболевание людей в связи с этим может быть обусловлено контактом при содержании и уходе за сельскохозяйственными животными, а также при работе в качестве персонала на убойных площадках, мясокомбинатах, молокозаводах. Трансформация возбудителя происходит различными путями: через молоко, через мясо, контаминированное возбудителем в период разделки туш животных, в период приготовления мясных, колбасных полуфабрикатов и т.д. Риск заражения людей существует при употреблении воды из озер, рек, если они подвергаются загрязнению сбросами с животноводческих ферм [5].

Для диагностики кампилобактериоза в ветеринарных лабораториях РК основным тестом (согласно руководства МЭБ) является бактериологический, однако, бактериологический анализ требует специальных условий культивирования и занимает значительное время. В последние годы для выявления возбудителя кампилобактериозов используют молекулярно-генетические методы: классическую полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) и *PCR-real time*. А мультиплексные ПЦР тест-системы, позволяют проводить одновременное выявление и дифференциацию кампилобактерий [6,7]. Однако, применение ПЦР в ветлабораториях затруднительно, из-за высокой стоимости оборудования и праймеров.

Несмотря на то, что данной патологии посвящено большое количество научных работ, до сих пор нет отечественного теста для проведения быстрой и достоверной диагностики кампилобактериоза сельскохозяйственных животных. Поэтому, актуальной задачей ветеринарной науки является разработка экспресс-теста для диагностики кампилобактериоза, который позволяет быстро и достоверно поставить диагноз. Таким тестом, отвечающим всем перечисленным требованиям, является иммунохроматографический тест, основным компонентом которого являются моноклональные антитела (МКА) к антигенным детерминантам возбудителя [8].

Целью работы является лабораторная апробация разработанного нами иммунохроматографического теста для экспресс-диагностики генитального кампилобактериоза крупного рогатого скота в сравнении с другими коммерческими тестами.

Для апробации теста проведен отбор 71 образца биологического материала (влагалищная слизь у коров) от животных из хозяйствующих субъектов Акмолинской области. Лабораторные испытания разработанного теста проводили в сравнении с классическими методами и коммерческими аналогами, для этого была предварительно изготовлена опытная партия тестов.

Проведение анализа с использованием разработанного ИХА теста проводили при комнатной температуре, в качестве исследуемых проб использовали образцы влагалищной слизи от коров. Исследуемый образец микропипеткой в объеме 80-100мкл вносили на подушку для внесения образца, при этом происходит абсорбция образца поглощающим участком подложки. При наличии в анализируемом образце искомого антигена, он связывался МКА, конъюгированными с частицами КЗ, образуя окрашенный комплекс. Этот комплекс двигался по мембране и связывался со специфическими ПКА, иммобилизованными на мембране в тестовой зоне планшета, образуя линию красного цвета на уровне маркировки Т (тест). Избыток моноклональных антител, конъюгированных с частицами коллоидного золота, образует окрашенный комплекс с антивидовыми антителами Antimouse Ig G в виде линии красного цвета на уровне маркировки С (контроль). Учет результатов реакции проводили визуально. Положительная реакция, т.е. обнаружение возбудителя или их антигенов,

характеризовалось 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 считали некорректным и проводили повторный анализ.

В результате исследования методом ИХА ни в одной из 71 исследуемой пробы не был обнаружен возбудитель *Campylobacter fetus* вида *veneralis*, тогда как при использовании положительного контроля на тест-мембране было зафиксировано появление двух окрашенных полос, что свидетельствует о положительной реакции.

Параллельно, часть образцов была исследована с помощью коммерческого набора ИХА «РЭД *Campylobacter*» (Россия) для выявления возбудителя в биологических объектах. 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 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 соответствует положительной реакции.

Для объективной оценки эффективности разработанного теста параллельно были проведены исследования этих же проб (71 образец) методом ПЦР-анализа с использованием праймеров, предназначенных для выявления возбудителя *Campylobacter fetus* spp. *fetus*. В результате исследования данных образцов методом ПЦР ни в одном случае наличие ДНК возбудителя выявлено не было.

Таким образом, проведены лабораторные испытания разработанного теста в сравнении с коммерческим тестом ИХА и методом ПЦР-анализа. В результате получены идентичные данные, подтверждающие отсутствие в исследованных образцах влажной слизи коров возбудителя кампилобактериоза. Лабораторные испытания позволяют сделать вывод о возможности использования разработанного теста в ветеринарной практике, поскольку результаты могут быть получены в течение 15 минут, без использования дополнительного оборудования.

По результатам исследования разработан лабораторный регламент по изготовлению компонентов ИХА-теста и применению его для экспресс-диагностики кампилобактериоза крупного рогатого скота.

Список литературы

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

2. 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.
3. 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. – Vol. 6 (10):e25778.
4. Truylers I, Luke T, Wilson D, Sargison N. Diagnosis and management of venereal campylobacteriosis in beef cattle. // *BMC Vet Res.* – 2014. Vol. 10. – P. 280.
5. Зыкин Л.Ф. Клиническая микробиология: достижения и перспективы // В кн.: Актуал. пробл. биотехнол. и вет. медицины. - Саратов, 1993 . – часть 2. – С. 3-14.
6. 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.
7. 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.
8. Gaiping Zhang, Junqing Guo, Xuannian Wang. Immunochromatographic Lateral Flow Strip Tests By // *Methods in Molecular Biology.* – 2008. – Vol. 504 (11). – P. 169-183.