

«Сейфуллин окулары – 16: Жаңа формациядағы жастар ғылыми – Қазақстанның болашағы» атты халықаралық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Международной научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 16: Молодежная наука новой формации – будущее Казахстана». - 2020. - Т.1, Ч.3 - С.240-243

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ АНТИГЕНОВ *CAMPYLOBACTER FETUS*, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

Боровиков С.Н., Жармышова М.Е.

Возбудитель *Campylobacter fetus* вызывает генитальный кампилобактериоз у крупного рогатого скота (вibriоз) и наносит большой экономический ущерб связанный с абортами, выбраковкой животных, наложением ограничительных мероприятий, ликвидацией молока, затраты на ветеринарные препараты и дезинфекцию. Основным источником возбудителя кампилобактериоза служат быки – производители. Распространение возбудителя осуществляется через корм, подстилку, воду, продукцию животноводства. Для диагностики кампилобактериоза используют бактериологические, иммунохимические и молекулярно-генетические методы анализа. Наиболее достоверным методом является бактериологический, только выделение возбудителя дает право устанавливать диагноз на кампилобактериоз. Однако, бактериологическая диагностика кампилобактериоза очень трудоемка, для роста кампилобактерий требуются условия с повышенным содержанием углекислого газа и приобретение дорогих селективных сред [1].

Интерес к кампилобактериозу обусловлен его чрезвычайно широким географическим распространением, интенсивной циркуляцией возбудителей среди людей и различных животных, высоким показателем заболеваемости и большим социально – экономическим ущербом от этой инфекции. Особую проблему кампилобактериоз приобретает в здравоохранении в связи с возрастающим значением его в качестве пищевой токсикоинфекции у человека. Согласно рекомендациям МЭБ, для выявления и дифференциации возбудителей кампилобактериоза, могут использоваться бактериологические методы и ПЦР-анализ с детекцией в режиме реального времени [2,3,4]. Однако, применение ПЦР в лабораториях затруднительно, из-за высокой стоимости оборудования и цены тест-систем (праймеров). В этой связи, весьма актуальным является проведение исследований по оптимизации методов получения специфического антигена *Campylobacter fetus*, который может быть использован при разработке экспресс-тестов, в частности, иммунохроматографического анализа.

Из бактериальной массы культуры *Campylobacter fetus venerealis* получали белковый антиген, используя три различные методики.

В первом случае применяли ультразвуковую дезинтеграцию (УЗД). Бактериальные клетки кампилобактерий подвергали воздействию ультразвуковых волн частотой 22 кгц интенсивностью 100 Вт\см², на дезинтеграторе U-2 (Чехословакия) в течение 60 мин. Взвесь перед разрушением, разводили в соотношении 1:10 физиологическим раствором. Дезинтеграцию осуществляли при визуальном контроле (до слабого

просветления) в течение 10-15 минут, затем определяли концентрацию белка по методу Бредфорд.

Во втором случае для получения антигена использовали цитратный буфер. К биомассе добавляли цитратный буфер в соотношении 1:2 и оставляли на ночь в термостате при температуре 37°C при постоянном перемешивании. На следующий день взвесь центрифугировали при 5000 об/мин 20 минут и использовали супернатант.

Согласно третьей методике, антиген *Campylobacter fetus* получали методом замораживания и оттаивания, с последующей ультразвуковой дезинтеграцией. Биомассу сливали в ступку и растирали в равном количестве жидкого азота. Далее к биомассе добавляли 1% SDS с NaOH в соотношении 1:2, смешивали, помещали в холодильник для замораживания. На следующий день замершую массу растирали до однородной массы и воздействовали на суспензию ультразвуковыми волнами частотой 22 кГц интенсивностью 100 Вт/см². Дезинтеграцию осуществляли при визуальном контроле (до слабого просветления) в течение 30 минут, далее центрифугировали при 5000 об/мин 20 мин. и получали супернатант.

Для изучения активности и специфичности полученных антигенов осуществляли постановку непрямого варианта ИФА. Сенсибилизировали планшеты антигенами в концентрации от 2 мкг/мл до 10 мкг/мл, блокировали свободные участки планшета 1% БСА, в качестве промывочного буфера использовали фосфатно-солевой буфер с твином. Инкубацию проводили в термостате при температуре + 37°C, использовали конъюгат *anti-bovis* (разведение 1:5000).

Проявляющим агентом служил субстрат ОФД, после появления окраски останавливали реакцию (0,05 М серная кислота) и учитывали результат с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (*ASYS Expert 96*, Австрия) при длине волны 492 нм. Полученные в итоге результаты представлены в таблицах 1-3.

Таблица 1 -Результаты определения активности антигена, полученного методом УЗД

Разведение сыворотки	Антиген (УЗД), концентрация - 250 мкг/мл		
	2 мкг/мл	5 мкг/мл	10 мкг/мл
1:25	0,789	0,868	0,942
1:50	0,642	0,724	0,770
1:100	0,558	0,654	0,641
1:200	0,412	0,562	0,585
1:400	0,347	0,421	0,498
1:800	0,220	0,368	0,367
1:1600	0,162	0,295	0,289
1:3200	0,096	0,173	0,173
1:6400	0,082	0,081	0,094
1:12800	0,075	0,074	0,081

1:25600	0,0	0,065	0,069
ОП отрицательного контроля - 0,095			

Таблица 2 -Активность антигена (метод добавления цитратного буфера)

Разведение сыворотки	АГ (метод добавления цитратного буфера) 500мкг/мл		
	2 мкг/мл	5 мкг/мл	10мкг/мл
1:25	0,675	0,925	0,865
1:50	0,590	0,850	0,742
1:100	0,467	0,723	0,686
1:200	0,313	0,662	0,565
1:400	0,254	0,522	0,478
1:800	0,183	0,416	0,398
1:1600	0,128	0,305	0,294
1:3200	0,091	0,274	0,196
1:6400	0,085	0,195	0,082
1:12800	0,073	0,089	0,078
1:25600	0,062	0,068	0,061
ОП отрицательного контроля - 0,107			

Таблица 3 -Активность антигена, полученного методом замораживания-оттаивания с УЗД

Разведение сыворотки	Антиген, полученный методом замораживания и оттаивания с последующим воздействием УЗД		
	2 мкг/мл	5 мкг/мл	10мкг/мл
1:25	0,905	0,989	1,156
1:50	0,812	0,856	1,073
1:100	0,745	0,752	1,020
1:200	0,697	0,635	0,995
1:400	0,563	0,562	0,824
1:800	0,486	0,437	0,790
1:1600	0,365	0,341	0,623
1:3200	0,198	0,267	0,562
1:6400	0,094	0,161	0,424
1:12800	0,086	0,086	0,340
1:25600	0,072	0,074	0,207
ОП отрицательного контроля - 0,096			

Как видно из таблицы 1, антиген полученный методом УЗД при концентрации 2 мкг/мл взаимодействует с положительной сывороткой в разведении 1:800, при использовании антигена в концентрации 5 мкг/мл и 10 мкг/мл происходит повышение титров специфических антител до значения –

1:1600. При этом оптическая плотность по показаниям спектрофотометра составила от 0,220 до 0,295 ОП.

Активность антигена, полученного путем добавления цитратного буфера отражена в таблице 2. При внесении антигена в концентрации 2 мкг/ мл он взаимодействует с положительной сывороткой в разведении 1:400, а при увеличении концентрации до 5 мкг/мл и 10 мкг/мл, происходит и повышение титров до 1:1600.

Наиболее высокая активность зафиксирована при использовании антигена, полученного методом замораживания и оттаивания с последующим воздействием УЗД. При этом получены следующие результаты: при концентрации антигена 2 мкг/мл происходит взаимодействие с положительной сывороткой в разведении 1:1600, при увеличении до 5 мкг/мл – 1:3200 и при использовании антигена в концентрации 10 мкг/мл зафиксирован максимальный титр антител, который был равен 1:12800.

В результате изучения активности полученных антигенов различными методами, было определено, что максимальный титр антител (1:12800) был выявлен в комбинации использования антигена, полученного методом замораживания и оттаивания с воздействием УЗД. Оптимальная концентрация антигена при этом составила 10 мкг/мкл .

Таким образом, определена оптимальная методика получения антигена *Campylobacter fetus venerealis*, который позволяет выявлять максимальный титр антител в сыворотке крови и может быть использован при конструировании диагностической тест-системы.

Список литературы

- 1.Савин И.С. Усовершенствование методов диагностики кампилобактериоза животных: дисс. кандидата ветеринарных наук. -СПб, 2008. –211с.
2. 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.
3. 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.
4. 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.