

«Сейфуллин окулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми -практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.1, Ч.III. - С.7-10

## **ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКАМ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ *CAMPYLOBACTER JEJUNI***

*Жахина А. А. докторант PhD I курс  
НАО «Казахский агротехнический университет им С.Сейфуллина» г. Нур-Султан*

Кампилобактериоз является одним из широко распространяющихся зоонозов в мире и основным возбудителем бактериального пищевого отравления у людей и сельскохозяйственных животных. Возбудители кампилобактериоза распространены повсеместно. Среди видов *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* и *C. upsaliensis*), способных вызывать заболевания у человека, *C. jejuni* чаще всего вызывает болезни пищевого происхождения, связанные с сельскохозяйственной продукцией [1, 2]. Помимо диарейных проявлений болезни описаны внекишечные осложнения инфекции *C. jejuni*, такие как реактивный артрит, панкреатит и кардит. Более того, некоторые штаммы *C. jejuni* способны стимулировать выработку антител реагирующие с миелином периферических нервов, вызывая синдром Гийена-Барре [3].

Основными резервуарами кампилобактеров являются дикие и домашние птицы, в первую очередь куры, домашние и сельскохозяйственные животные, включая крупный рогатый скот, овец, свиней, собак, кошек (в особенности щенков и котят), других мелких домашних животных [4, 5].

Повышенная устойчивость *C. jejuni* к антибиотикам и сложность снижения показателей диарейных заболеваний в последние годы усилили акцент на разработке инновационных методов диагностики с целью сокращения присутствия *C. jejuni* у сельскохозяйственных животных, и продуктах потребляемых людьми, а также в водоемах, чтобы снизить риск заражения этой инфекцией. По данным ВОЗ кампилобактериозом болеет до 550 миллионов человек в год [6, 7].

На сегодняшний день основным диагностическим тестом является бактериологический, однако, он требует специальных условий культивирования и дорогостоящих питательных сред. Для выявления возбудителя также используют полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) и иммуноферментный анализ [8], но данные методы также требуют наличия оборудования и специальных условий [9].

В условиях интенсификации сельскохозяйственного производства, есть потребность в наличии простых, быстрых и достоверных методов выявления зараженных животных и продуктов животноводства, одним из таких методов

является иммунохроматографический анализ. Внедрение иммунохроматографического метода в ветеринарную практику позволит сократить время анализа до 5-15 минут и получать результаты с высокой степенью достоверности [10].

Для конструирования ИХА-теста используются три типа антител: подвижные моноклональные антитела к исследуемому антигену или антителу, с коллоидным золотом; поликлональные антитела к исследуемому антигену, жестко иммобилизованные в тест-зоне полоски и вторичные антитела к моноклональным антителам, жестко иммобилизованные в контрольной зоне тест-полоски. От качества каждого компонента зависит и достоверность теста.

Целью нашего исследования является получение поликлональных антител к рекомбинантным белкам внешней мембраны *Campylobacter jejuni*.

#### Материалы и методы исследований

В качестве антигена были использованы рекомбинантные белки внешней мембраны *C.jejuni* (Omp18 и МОМР) полученные С.Н.Боровиковым с соавт.

В качестве лабораторных животных использованы кролики породы советская шиншилла (3 гол., самцы 6 месячного возраста с живой массой по 3-4 г). Все процедуры, связанные с уходом за лабораторными животными, выполнялись в соответствии с Руководством по содержанию и уходу за животными: особые условия для лабораторных грызунов и кроликов (Межгосударственный стандарт, ГОСТ 33216-2014). Также руководствовались Международными принципами для биомедицинских исследований с участием животных, 2012 г (*International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*) и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, 2005 г (*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes*). Уход и использование лабораторных животных одобрены Комиссией по этике животных факультета Ветеринарии и технологии животноводства Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина (КАТУ), Нур-Султан.

Иммунизацию животных проводили подкожно, в 5 точек вдоль хребта с обеих сторон, вводили препарат в дозе 0,25 мл в каждую точку. Инъекции проводили с использованием полного и неполного адьюванта Фрейнда (ПАФ и НАФ)

Исследование сывороток крови проводили в н-ИФА. Лунки полистиролового планшета (ThermoFisherScientific, США) сенсibilизировали отдельно белковыми антигенами *Omp18* и *МОМР*. После сенсibilизации и отмычки лунок активные центры твердой фазы нейтрализовали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. Далее, в двух лунках готовили разведения сывороток крови иммунизированных животных в PBS-Тв, инкубировали в течение 1 часа и после отмычки планшета в лунки вносили анти-кроличьи IgG антитела, меченые пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich США). Результаты реакции проявляли с помощью субстрата фермента. Реакцию считали по-

ложительной, если показатель оптической плотности исследуемой сыворотки (ОПис) в 2, и более раз превышал среднее значение оптической плотности контрольного образца (ОПко) в разведении 1:100. В качестве негативного контроля была использована сыворотка крови неиммунизированного кролика.

Результаты исследований

С целью получения поликлональных антител была проведена иммунизация лабораторных животных рекомбинантными белками внешней мембраны *S.jejuni* (Omp18 и MOMP) по схеме, представленной в таблице 1.

Таблица 1 – Схема иммунизации кроликов рекомбинантными антигенами

| Дни иммунизаций | I группа животных                                          | II группа животных                     |
|-----------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
|                 | Наименование АГ и доза                                     | Наименование АГ и доза                 |
| 1 день          | Omp18 (250мкг/мл) 750 мкл +ПАФ 750 мкл                     | MOMP (250мкг/мл) 750 мкл +ПАФ 750 мкл  |
| 14 день         | Omp18 (250мкг/мл) 750 мкл +НАФ 750 мкл                     | MOMP (250мкг/мл) 750 мкл +НАФ 750 мкл  |
| 28 день         | Отбор крови для проведения тестирования на наличие антител |                                        |
| 28 день         | Omp18 (250мкг/мл) 750 мкл +PBS 750 мкл                     | MOMP (250мкг/мл) 750 мкл + PBS 750 мкл |
| 42 день         | Omp18 (250мкг/мл) 750 мкл + PBS 750 мкл                    | MOMP (250мкг/мл) 750 мкл + PBS 750 мкл |
| 49 день         | Тотальный отбор крови                                      |                                        |

Как видно из таблицы 1, схема иммунизации предусматривала четырехкратное подкожное введение антигенов кроликам в концентрации 250 мкг/мл с полным и неполным адьювантом Фрейда. Перед проведением третьей иммунизации у кроликов была отобрана кровь для проведения непрямого варианта иммуноферментного анализа на наличие антител, на 49-й день был проведен тотальный отбор крови и исследование в н-ИФА. Результаты тестирования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты тестирования крови иммунизированных кроликов в н-ИФА

| Группы иммунизированных кроликов | Титр специфических антител |           |
|----------------------------------|----------------------------|-----------|
|                                  | 28 день                    | 49 день   |
| I группа                         | 1:51 200                   | 1:204 800 |
| II группа                        | 1:25 600                   | 1:102 400 |
| Контрольная                      | PO                         | PO        |

В результате проведения н-ИФА, в сыворотке крови иммунизированных животных были обнаружены высокие титры антител к исходному антигену. Максимальные значения титров антител к рекомбинантным белкам внешней мембраны *C.jejuni* (Omp18 и МОМР), находились в диапазоне от 1:102 400 до 1:204 800, соответственно.

Таким образом, доказана иммуногенность полученных ранее рекомбинантных антигенов внешней мембраны *Campylobacter jejuni*. А использование приведенной выше схемы иммунизации можно рекомендовать для получения специфических поликлональных антител и в дальнейшем использовать их как компонент для конструирования ИХА теста для диагностики *Campylobacter jejuni* у животных и обнаружения в продуктах животного происхождения.

### Список литературы

1 Qu M., Zhang M., Zhang X., Jia L., Xu J., Chu Y., Liang Z., Lu B., Liang H., Huang Y., Wang Q. Molecular and epidemiological analysis of a *Campylobacter jejuni* outbreak in China //J.Infect.Dev.Ctries. – 2018. – Vol. 13. – P.1086-1094.

2 Salihu M.D., Abdulkadir J.U., Oboegbulem S.I., Egbu G.O., Magaji A.A., Lawal M., Hassan Y. Isolation and prevalence of *Campylobacter* species in cattle from Sokoto state Nigeria //VeterinariaItaliana. – 2009. – Vol. 45. – P. 501-505.

3 Di Giannatale E., Calistri P., DiDonato G., Decastelli L., Goffredo E., Adriano D., Mancini M.E., Galleggiante A., Neri D., Antoci S., Marfoggia C., Marotta F., Nuvoloni R., Migliorati G. Thermotolerant *Campylobacter* spp. in chicken and bovinemeat in Italy: Prevalence, level of contamination and molecular characterization of isolates //PloSOne. –2019. – Vol. 14. – P. 22-595.

4 WHO. – URL:  
<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>

5 Rodgers J.D., Simpkin E., Lee R., Clifton-Hadley F.A., Vidal A.B. Sensitivity of DirectCulture, Enrichment and PCR for Detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Broiler Flocks at Slaughter //Zoonoses Public Health. –2017. – Vol. 64. – P. 262-271.

6 Gürtürk K., Ekin I.H., Aksakal A., Solmaz H. Detection of *Campylobacter* antibodies in sheep sera by a Dot-ELISA using acid extracts from *C. fetus* ssp. *fetus* and *C. jejuni* strains and comparison with a complement fixation test //J.Vet.Med. B Infect Dis Vet Public Health. –2002. – Vol. 49. – P.51-146.

7 Longbottom D, Fairley S, Chapman S, Psarrou E, Vretou E, Livingstone M. Serological Diagnosis of Ovine Enzootic Abortion by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Recombinant Protein Fragment of the Polymorphic Outer Membrane Protein POMP90 of *Chlamydia abortus* //Journal of clinical microbiology. – 2002. – Vol. 40. – P. 4235–4243.

8 Burnens A., Stucki U., Nicolet J., Frey J. Identification and Characterization of an Immunogenic Outer Membrane Protein of *Campylobacter jejuni* //Journal of Clinical Microbiology. – 1995. – Vol.33, No.11. – P.2826-2832.

9 Pavlova M., Velev V., Dobрева E., Asseva G., Ivanov I., Tomova I., Kantardjiev T Advantages of EVA green real-time mPCR with culture and immunochromatographic methods for differentiating C. Jejuni/Coli directly from feces // ActaMedicaMediterranea. – 2018. –Vol.34. – P.1027-1030

10 Xu D Wu X Li B Li P Ming X Chen T Wei H Xu F Rapid detection of Campylobacter jejuni using fluorescent microspheres as label for immunochromatographic strip test // Food Science and Biotechnology. – 2013. – Vol.22. – P.585-591