

«М.А. Гендельманнның 110 жылдығына арналған «Сейфуллин окулары – 19» халықаралық ғылыми-практикалық конференциясының материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 19», посвященной 110 - летию М.А. Гендельмана» - 2023.- Т. II, Ч. I.- С. 165-168.

УДК: 614.446. 637.07

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ В ИФА ПРИ ДИАГНОСТИКЕ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА

Мусеипова З.А., студент 4 курса  
Боровиков С.Н., к.б.н, и.о.профессора  
Казахский агротехнический исследовательский  
университет им. С.Сейфуллина, г. Астана

Инфекционное заболевание кампилобактериоз, считается первым этиологическим агентом диареи в развитых странах, и вторым или третьим в развивающихся странах, вызываемых микроорганизмами рода *Campylobacter* [1,2]. Наиболее значимая патогенная роль при кампилобактериозах животных отводится *Campylobacter jejuni* [3]. У молодняка *C. jejuni* выделяют не только при дизентериях, но и в кишечнике клинически здоровых животных. Есть данные, что около 25% животных могут являться скрытыми бактерионосителями [4]. Экономический ущерб обусловлен снижением продуктивности животных, а зараженные животные и их продукция являются причиной инфицирования людей. По данным исследователей до 70% случаев заболевания кампилобактериозом связано с употреблением контаминированных пищевых продуктов и воды [5, 6]. В настоящее время, кампилобактериоз признают значимой пищевой токсикоинфекцией, и является одной из основных причин болезней желудочно-кишечного тракта. По данным ВОЗ кампилобактериозом болеет до 550 миллионов человек в год (в т.ч. 220 миллионов детей младше 5 лет) [7].

Основным диагностическим тестом является бактериологический, однако, он требует специальных условий культивирования и дорогостоящих питательных сред. Также в настоящее время, для выявления возбудителя используют полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) [8,9], однако данный метод требует наличия оборудования, дорогостоящих наборов и специальных лабораторных условий.

На сегодняшний день, наиболее распространенным способом диагностики кампилобактериоза животных является иммуноферментный анализ (ИФА) как наиболее чувствительный и специфичный метод исследования. Однако в большой степени эффективность и чувствительность метода зависит от качества используемых антигенов. Использование ранее полученных рекомбинантных иммунодоминантных белков *C. jejuni* вместо смеси антигенов, полученных с помощью ультразвуковой дезинтеграции бактерий, позволяет избежать неспецифических реакций. Кроме того, полученный штамм-продуцент может

длительное время синтезировать стандартный по всем параметрам антиген, а тесты, основанные на рекомбинантных белках, могут повысить стандартизацию анализа по сравнению с природными антигенами [10,11].

Целью исследования является изучение возможности использования рекомбинантных антигенов в ИФА при диагностике кампилобактериоза у крупного рогатого скота.

Основные этапы исследований проводились в лаборатории иммунохимии Научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии КАТУ им. С.Сейфуллина в 2022-2023 гг.

*Материалы и методы.* В работе использованы два вида рекомбинантных белков Omp18 и MOMP32 (синтезированные белки внешней мембраны *C. jejuni*), полученные в лаборатории иммунохимии и иммунобиотехнологии Национального центра биотехнологии, сыворотки крови крупного рогатого скота из хозяйств Карагандинской области в количестве 94 пробы.

Материалы для проведения ИФА: бикарбонатный буфер *pH* 9,5-9,6, PBS×1(ThermoScientific) +Tween 20, конъюгат Rabbit anti-bovine IgG (Sigma-Aldrich), 0,1 % раствор BSA, ТМБ, стоп-реагент.

Непрямой вариант ИФА проводили по стандартной методике. Лунки 96-ти луночных планшетов (Maxisorb, ThermoScientific) были иммобилизованы рекомбинантными антигенами Omp18 или MOMP32 *C. jejuni* в концентрации 0,001мг/мл в бикарбонатном буфере *pH*9,5-9,6, инкубацию проводили при 4 °С в течение 14 часов. Отмывку лунок проводили с помощью автоматического промывочного аппарата, PBS×1 в присутствии Tween 20. Блокировку свободных участков проводили 0,1 % раствором BSA при 37 °С 1 час. Повторяли процедуру отмывки.

Внесение сывороток крови проводили с предварительным разведением, для этого в чистый планшет и планшеты с иммобилизованными антигенами вносили 0,09 мл PBS×1, затем в чистый планшет вносили 0,01мл исследуемой сыворотки, ресуспендировали и переносили 0,01 мл в планшеты с иммобилизованными антигенами. Сыворотки в лунки планшета вносили в одинаковой последовательности для проверки двух видов антигенов. В качестве отрицательного контроля использовали фетальную сыворотку плода, инкубировали при 37 °С 1 час. Повторяли процедуру отмывки. Антивидовой конъюгат Anti-bovine IgG вносили в рабочем разведении 1:10 000. Инкубировали 1 час при 37 °С. Отмывали планшеты.

В качестве субстрата использовали ТМБ (PanReacAppliChem). Инкубировали при комнатной температуре, в темном месте 10-15 мин. Остановку реакции проводили стоп реагентом (0,2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Считывание результатов проводили с помощью спектрофотометра BioSan (Латвия) при длине волны 450нм. Реакцию считали положительной, если показатель оптической плотности исследуемой сыворотки (ОПис.) в 2, и более раза превышал среднее значение оптической плотности контрольного

образца (ОПко) в разведении 1:100. Показатели оптической плотности представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Результаты тестирования сывороток крови антигеном Omp18

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,33 5	0,20 6	0,01 2	0,51 3	0,06 9	0,14 6	0,04 4	0,13 7	0,15 6	0,15 9	0,11 9	0,03 6
B	0,46 5	0,25 9	0,06 3	0,37 0	0,21 5	0,15 4	0,30 9	0,64 1	0,57 7	0,23 6	0,22 0	0,08 9
C	0,44 8	0,36 6	0,00 0	0,05 3	0,37 6	0,17 5	0,09 3	0,02 2	0,14 1	0,12 4	0,01 9	0,10 8
D	0,37 6	0,12 1	0,00 0	0,10 1	0,36 0	0,14 4	0,12 3	0,06 9	0,08 1	0,01 3	0,00 3	0,00 2
E	0,19 5	0,20 3	0,00 0	0,00 3	0,31 0	0,03 6	0,04 4	0,12 3	0,17 0	0,09 4	0,07 8	0,01 4
F	0,31 9	0,28 3	0,00 0	0,05 7	0,31 6	0,41 4	0,04 2	0,03 2	0,08 6	0,47 8	0,29 1	0,27 0
G	0,44 4	0,26 6	0,00 4	0,30 1	0,69 7	0,11 7	0,11 2	0,08 9	0,10 9	0,20 8	0,20 3	0,70 1
H	0,38 5	0,14 7	0,02 6	0,17 3	0,24 3	0,09 8	0,29 6	0,07 2	0,29 2	0,10 5	0,05 5	Neg 0,12 5

Таблица 2 – Результаты тестирования сывороток крови антигеном MOMP32

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,55 5	0,15 3	0,10 4	0,69 3	0,12 7	0,14 7	0,16 7	0,11 8	0,18 3	0,63 7	0,20 5	0,27 0
B	0,02 4	0,15 4	0,16 3	0,59 6	0,36 1	0,07 0	0,31 3	0,15 9	0,06 7	0,36 8	0,14 9	0,26 2
C	0,37 3	0,27 8	0,36 3	0,28 5	0,16 9	0,21 6	0,12 1	0,20 5	0,19 2	0,62 6	0,10 8	0,11 2
D	0,40 9	0,07 6	0,20 8	0,37 9	0,12 0	0,04 9	0,07 7	0,11 6	0,10 0	0,24 2	0,15 2	0,23 4
E	0,58 7	0,27 1	0,11 3	0,42 3	0,18 6	0,22 2	0,06 5	0,12 5	0,08 1	0,10 0	0,22 2	0,17 2
F	0,16 6	0,15 2	0,11 3	0,75 3	0,36 6	0,25 5	0,11 4	0,20 2	0,07 1	0,04 7	0,23 4	0,27 4
G	0,30 6	0,19 9	0,01 6	0,41 1	0,21 7	0,19 2	0,11 7	0,13 5	0,25 1	0,22 6	0,11 5	0,38 0
H	0,23 7	0,14 1	0,24 1	0,42 2	0,23 5	0,16 0	0,11 3	0,08 7	0,14 6	0,23 6	0,23 9	Neg 0,10 8

Как видно из результатов проведения иммуноферментного анализа с рекомбинантными антигенами, положительно реагирующие сыворотки были

выявлены как при использовании антигена Omp18, так и МOMP32. При этом установлено, что при использовании антигена МOMP32 отмечено больше позитивных сывороток.

Таким образом, установлена потенциальная возможность использования полученных рекомбинантных белков при диагностике кампилобактериоза крупного рогатого скота. Полученные данные представляют определенный интерес, поскольку при разработке диагностических тестов предпочтение отдают стандартным по всем параметрам антигенам, которые могут повысить качество анализа по сравнению с нестабильными природными антигенами. Исследования в данном направлении будут продолжены.

### Список литературы

1 Collado L. Microbial diagnosis and epidemiological surveillance of campylobacteriosis in Chile: Present state and further challenges [Text] / Collado L // Rev Chilena Infectol. – 2020. – Vol.3. – P.244-251

2 Qu M. Molecular and epidemiological analysis of a *Campylobacter jejuni* outbreak in China [Text] / Qu M., Zhang M., Zhang X., Jia L., Xu J., et al. // J. Infect. Dev. Ctries. – 2019. Vol.13. – P.1086-1094

3 Salihu M.D. Isolation and prevalence of *Campylobacter* species in cattle from Sokoto state Nigeria [Text] / 3 Salihu M.D., Abdulkadir J.U., Oboegbulem S.I., Egwu G.O., Magaji A.A., et al. // Veterinaria Italiana. – 2009. – Vol.45. – P. 501-505.

4 Garcia M.M., Lior H., Stewart R.B., Ruckerbauer G.M., Trudel J.R.R., Skljarevski A. Isolation, characterization, and serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from slaughter cattle [Text] / Garcia M.M., Lior H., Stewart R.B., Ruckerbauer G.M., Trudel J.R.R., Skljarevski A. // Applied and Environmental Microbiology. – 1985. – Vol.49. – P. 667–672.

5 Di Giannatale E. Thermotolerant *Campylobacter spp.* in chicken and bovine meat in Italy: Prevalence, level of contamination and molecular characterization of isolates [Text] / Di Giannatale E., Calistri P., Di Donato G., Decastelli L., Goffredo E., Adriano D., et al // PLoS One. – 2019. Vol.14. – P.22-595

6 Информационный бюллетень Всемирной организации здравоохранения; 2022. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>

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

8 Gürtürk K. 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 [Text] / Gürtürk K., Ekin I.H., Aksakal

A., Solmaz H. // J. Vet. Med. B Infect Dis Vet Public Health. –2002. – Vol.49. – P.146-51.

9 Gaiping Z., JunqingG., Xuannian W. Immunochromatographic Lateral Flow Strip Tests By test[Text] / Gaiping Z., JunqingG., Xuannian W. // Methods in Molecular Biology. – 2008. – Vol. 504.–P. 169-183.

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

11 Schmidt-Ott R. Improved serodiagnosis of *Campylobacter jejuni* in fections using recombinant antigens test [Text] / // Schmidt-Ott R., Brass F., Scholz Ch., Werner C., Groß U. Journal of Medical Microbiology. – 2005. – Vol.54. – P.761-767.