

УДК 8.579.62

РАЗРАБОТКА ТЕСТА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОГО АБОРТА ЛОШАДЕЙ

Базылов А.К., магистрант 2 курса
Боровиков С. Н., кандидат биологических наук, и.о.профессора
Казахский агротехнический исследовательский университет им.
С.Сейфуллина
г. Астана

Сальмонеллез является одним из наиболее опасных зоонозных заболеваний. Возбудитель *Salmonella* относится к *Enterobacteriaceae*, является возбудителем «пищевых отравлений», гастроэнтеритов, брюшного тифа и паратифа. Бактерии способны заражать многих животных, включая млекопитающих, птиц и людей [1]. *Salmonella enterica subspecies enterica serovar abortus equi* является патогеном ослов [2] и лошадей, который вызывает аборт кобыл, неонатальный сепсис и полиартриты [3].

Наиболее восприимчивы к заболеванию кобылы во время их первой беременности, а также новорожденные жеребята [4,5].

У больного животного может развиваться лихорадка с тяжелыми системными признаками, включая гнойные и зловонные кровянистые выделения из влагалища, который сохраняется в течение длительного периода, приводя к бесплодию кобыл или частым абортам. В некоторых случаях заражение сальмонеллой приводило к артриту, ламиниту и пневмонии. Без своего временного лечения инфекция может перейти в септицемию и привести к летальному исходу [6,7].

В настоящее время численность поголовья лошадей в Республике Казахстан составляет более 3 миллионов, но дальнейшее развитие этой отрасли сдерживается наличием инфекционных болезней, в частности сальмонеллезным абортom. Сальмонеллезный аборт кобыл одна из распространенных инфекций, наносящая значительный экономический ущерб коневодству не только в РК, но и в других странах [8,9]. Экономический ущерб складывается из потери воспроизводительной способности конематок, недополучения приплода, снижения продуктивности кобыл и выбраковки животных. Для диагностики инфекции в ветлабораториях РК основным методом является бактериологический, только выделение возбудителя дает право устанавливать диагноз на сальмонеллезный аборт. Согласно руководства МЭБ, идентификация самого

возбудителя является основным предписывающим тестом (<http://www.oie.int/>). Однако, бактериологическая диагностика уступает по чувствительности и очень сильно зависит от качества материала. Согласно рекомендациям МЭБ, для выявления и дифференциации возбудителей *S. abortus equi*, могут использоваться ПЦР и ПЦР с детекцией в режиме реального времени, ИФА [10,11].

Однако, применение этих методов в ветлабораториях затруднительно, из-за высокой стоимости оборудования и высокой цены тест-систем (праймеров), поэтому разработка простого, эффективного и экономически обоснованного способа диагностики сальмонеллезного аборта кобыл остается актуальной проблемой ветеринарной науки и практики.

Целью работы является определение оптимальных доз основных компонентов теста и условия сборки ИХА-теста для экспресс-обнаружения возбудителей сальмонеллезного аборта кобыл в биологическом материале.

Методы исследования. Основные этапы исследований проводились в лаборатории иммунохимии Научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии КАТУ им. С.Сейфуллина в 2024 г., применялись физико-химические, серологические и биотехнологические методы исследований.

Растворы коллоидного золота (КЗ) получали по методу Френса [12,13]. Приготовление конъюгата наночастиц золота с антителами осуществляли так, к 100 мкл раствора поликлональных антител (ПКА) добавляли по 1 мл раствора КЗ, перемешивали и инкубировали 10 мин. В каждую пробирку добавляли по 100 мкл 10 %-ного хлорида натрия, перемешивали. К раствору КЗ добавляли 0,2 М K_2CO_3 до достижения pH 8,5 и вносили в раствор антител выбранной концентрации. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивании, затем для блокирования свободных участков вносили бычий сывороточный альбумин до концентрации 0,25%. Частицы золота с антителами отделяли центрифугированием при 8000 g 30 мин. Осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4, содержащем 0,25% БСА [13].

Предварительно опытным путем были определены оптимальные дозы и условия использования основных компонентов теста. Для сборки теста раствор конъюгат наносили в объеме 11 мкл на стекловолокнистые мембраны «*Advanced Microdevices*» (Индия). На полоски основной мембраны наносили раствор ПКА с помощью программируемого автоматического диспенсера *EasyPrinter Модель LMP-0.2* для формирования аналитической зоны. Для формирования контрольной зоны системы наносили раствор протеина G с концентрацией 1 мг/мл. Мембраны высушивали при комнатной температуре и склеивали, полученные поликомпозиционные листы нарезали на тест-полоски с помощью аппарата «*Advanced Sensor system*» (Индия).

Проведение анализа и учет результатов. Исследуемую пробу, в объеме 80-100 мкл, вносили на подложку для внесения образца. Положительная реакция характеризуется появлением на мембране двух окрашенных линий (в

тестовой и контрольной зонах). При отрицательной реакции образуется линия в зоне контроля. Если после проведения анализа не образовалась линия в зоне контроля, результат считается некорректным и подлежит повторному анализу.

Результаты исследования. Для формирования тестовой и контрольной зоны на мембрану с помощью автоматического диспенсера наносили раствор ПКА и на расстоянии 5 мм раствор белка G. Для оптимизации концентрации ПКА, полученных ранее к рекомбинантному антигену OmpX *S. abortus equi* готовили двукратные разведения от: 25 до 2000 мкг/мл, для белка G (Rockland Immunochemicals, Pennsylvania, США) использовали концентрации от 100 до 1000 мкг/мл. В результате эксперимента установили, что оптимальная концентрация нанесения белка G в контрольной зоне мембраны составляет 500 мкг/мл, а ПКА в тестовой зоне – 0,1 мг/мл.

Для определения чувствительности избранного теста использовали раствор антигена, полученного путем ультразвуковой дезинтеграции бактерий *S. abortus equi* в концентрациях от 1 нг/мл до 100 мкг/мл. Растворы антигена наносили в «окно» для внесения образца в количестве 80-100 мкл. Учет результатов реакции проводили визуально, при комнатной температуре. Положительная реакция характеризуется появлением на мембране двух окрашенных линий (в тестовой и контрольной зонах). При отрицательной реакции образуется линия в зоне контроля. Опыт проводили в 3-х повторях, через 15 минут оценивали результат.

Порог чувствительности теста соответствовал концентрации 10 нг растворимого антигена. Специфичность определяли путем использования гомологичных и гетерологичных антигенов с известной концентрацией.

Взаимодействие компонентов теста происходит при использовании рекомбинантного белка OmpX и УЗД антигена *S. abortusequi*, в остальных случаях результаты отрицательные.

Результаты показали, что сконструированная тест-система обладает специфичностью и позволяет определить наличие мажорного белка внешней мембраны кампилобактер в продуктах животноводства в концентрации не ниже 10 нг/мл.

Таким образом, изготовлены компоненты и проведена сборка иммунохроматографического теста для обнаружения возбудителя сальмонеллёзного аборта лошадей в образцах биологического материала. Лабораторные испытания подтверждают эффективность разработанного теста, поскольку позволяют выявлять антиген возбудителя в исследуемом материале в концентрации не менее 10 нг/мл и получать результаты в течение 15 минут. Анализ материала может проводиться в условиях фермы, без использования дополнительного оборудования и может быть рекомендован для внедрения в ветеринарную практику.

Список литературы

- 1 Francesca, M., Sue, K., Joanna, L. (2018). Salmonella and salmonellosis in horses an overview, *Vet. Rec.*, 182(23), 659–660.
- 2 Wang, H., Liu, KJ, Sun, YH. (2019). Abortion in donkeys associated with *Salmonella abortus equi* infection, *Equine. Vet. J.*, 51(6), 756–759.
- 3 Bustos, CP, Gallardo, J., Retamar, G. (2016). *Salmonella enterica* serovar *Abortus equi* an emergent pathogen causing equine abortion in Argentine. *J. Equine Vet.*, 39, 58–S59.
- 4 Rodriguez, A., Pangloli, P., Richards, HA. (2006). Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples, *J. Food Protect.*, 69, 2576–2580.
- 5 Swerczek, TW. (1991). Identifying the bacterial causes of abortion in mares, *Vet. Med.*, 86, 1210–1216.
- 6 Grandolfo, E., Parisi, A., Ricci, A. (2018) High mortality in foals associated with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* *Abortus equi* infection in Italy, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 30(3), 483–485.
- 7 Juffo, GD, Bassuino, DM, Gomes, DC. (2017). Equine salmonellosis in southern Brazil, *Trop. Anim. Health Prod.*, 49(3), 475–482.
- 8 Mudit, Ch., Gurpreet, K. (2018). An Update on Equine Salmonellosis. *EC. Veterinary Science*, 3(3), 348-354.
- 9 Borovikov, S., Syzdykova, A., Akibekov, O., Tursunov, K. (2023). The Use of Various Tests for the Serological Diagnosis of *Salmonella* Abortion in Horses in Kazakhstan. *Int. J. Vet. Sci.*, 1-4.
- 10 Amavisit, P., Browning, GF, Lightfoot, D., Church, S., Anderson, GA, Whithear, KG, Markham, PF. (2001). Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples. *Veterinary Microbiology*, 79(1), 63-74. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00340-0
- 11 Gall, D., Nielsen, K., Bermudez, RM, Muñoz del Real, MC, Halbert, G., Groulx, R., Moreno, F., Chow, EY, Checkley, SL. (2016). Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detecting equine serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Salmonella abortusequi* Research in. *Veterinary Science*, 81(2), 215-217. doi:10.1016/j.rvsc.2005.11.004
- 12 Frens, G. (1973). Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse Gold suspensions. *Nature Phys. Sci.*, 241, 20-22.
- 13 Боровиков, СН, Кудайбергенова, ЭБ, Ташмагамбет, ЖА. (2017). Изготовление компонентов теста для диагностики кампилобактериоза крупного рогатого скота. *Материалы Республиканской научно-теоретической конференции Сейфуллинские чтения -13: сохраняя традиции, создавая будущее.* Астана. 1. 134-137.