

УДК 8:579.6

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Мусеипов З.А. магистрант 2 курса
Сыздыкова А.С., магистр технических наук
Боровиков С. Н., кандидат биологических наук, и.о. профессора
Казахский агротехнический исследовательский университет им.
С.Сейфуллина,
г. Астана*

Введение. Кампилобактериоз - антропозоонозная инфекция, вызываемая бактериями рода *Campylobacter*, является одной из наиболее распространенных причин бактериального гастроэнтерита у человека во всем мире [1].

Campylobacter jejuni является доминирующим видом, ответственным за более чем 80% случаев заболевания кампилобактериозом. Бактерии рода *Campylobacter* широко распространены в кишечнике птиц и животных. Человек может заразиться кампилобактериозом через потребление недостаточно термически обработанного мяса, непастеризованного молока, а также через контакт с зараженными животными [2,3].

При кампилобактерной инфекции возникает два основных типа поражения:

1. Желудочно-кишечные инфекции (ЖКИ): проявляются воспалением желудочно-кишечного тракта, вызывая диарею, тошноту, боли в животе и другие симптомы [4].

2. Экстражелудочно-кишечные инфекции (ЭКИ): проявляются вне кишечника, но связаны с предыдущим поражением кишечника. К ним относятся синдром Рейтера (реактивный артрит, поражающий суставы, вызывая боли и дисфункцию), синдром Гийена-Барре (тяжелая неврологическая дисфункция, неврологические расстройства и полиоподобная форма паралича) [5,6].

Диагностика кампилобактериозной инфекции основывается на применении иммуноферментного анализа (ИФА) или ПЦР, оба метода обладают высокой чувствительностью (98,5%) и специфичностью (98,2%). Однако, ИФА является более универсальным и доступным методом для оценки иммунного ответа организма на инфекцию, по сравнению с ПЦР. Кроме того, ИФА отличается более низкой стоимостью и более часто

используется в лабораториях для исследований [7]. При применении ИФА важное значение имеет состав и происхождение используемых антигенов, чем выше однородность и чистота антигена, тем выше достоверность (специфичность) полученных результатов.

Целью настоящей работы является разработка ИФА-тест системы для серологической диагностики кампилобактериоза на основе использования рекомбинантных антигенов *C. jejuni*.

Использование рекомбинантных антигенов *C. jejuni* в ИФА-тест системе для серологической диагностики кампилобактериоза представляет собой перспективное направление, т. к. рекомбинантные антигены содержат определенные белковые компоненты *C. jejuni*, что снижает вероятность неспецифических реакций с антителами других бактерий. Это позволяет увеличить точность диагностики и снизить количество ложноположительных результатов.

Основные этапы исследований проводились в лаборатории иммунохимии Научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии КАТУ им. С.Сейфуллина в 2024 г.

Материалы: ранее полученные рекомбинантные антигены *C. jejuni* (Omp 18 и MOMP32), коммерческий нативный антиген *C. jejuni* (Native Antigen, Великобритания); образцы сывороток крови крупного рогатого скота из хозяйств Карагандинской области, бикарбонатный буфер pH 9,6, забуференный физиологический раствор с твином (ЗФР-Тв20), полистироловый планшет (ThermoFisherScientific, США), одноканальный дозатор пипетка с регулируемым объемом 1–20 мкл, многоканальный дозатор пипетка с регулируемым объемом 30–300 мкл (ThermoFisherScientific, США), одноразовые пластиковые Чашки Петри, наконечники для пипетки-дозатора 10–300 мкл, фильтровальная бумага.

Методы исследования: в работе использованы различные варианты проведения иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантных белков Omp18 и MOMP32 внешней мембраны *C. jejuni*, полученные в лаборатории иммунохимии и иммунобиотехнологии Национального центра биотехнологии МОН РК.

Были исследованы 196 образцов сывороток крови от крупного рогатого скота из хозяйств Карагандинской области. Исследование сывороток крови проводили в непрямом ИФА. Лунки полистиролового планшета (ThermoFisherScientific, США) сенсibilизировали отдельно белковыми антигенами в концентрации 14,5 мкл. После сенсibilизации и отмывки лунок активные центры твердой фазы нейтрализовали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA). Далее готовили разведения сывороток крови животных в PBS и вносили точно после инкубировали в течение 1 часа, затем в отмывые лунки вносили anti-bovis IgG антитела, меченые пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich США). Результаты реакции проявляли с помощью субстрата ТМБ, учет результата в спектрофотометре осуществлялся при длине волны 450 нм. 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. В качестве негативного контроля была использована фетальная сыворотка [8].

Результаты. Анализ тестирования сыворотки крови крупного рогатого скота с использованием различных антигенов показал следующие результаты. При использовании коммерческого нативного антигена было выявлено 86 положительных сывороток, что составляет 43,8%. Специфические антитела к рекомбинантному антигену МОМР32 достоверно были подтверждены в 123 образцах сывороток (62,7%), а в случае использования рекомбинантного антигена ОМР 18 взаимодействие с сывороточными антителами зафиксировали в 89 образцах, что составляет 45,4% от общего числа исследованных сывороток.

С целью определения диагностической ценности рекомбинантных антигенов был проведен анализ полученных результатов путем сравнения количества совпадений, положительно среагировавших образцов сывороток крови с рекомбинантными и нативными антигенами.

Таблица 1 – Анализ результатов исследований сывороток крови крупного рогатого скота методом ИФА на основе различных антигенов

Нативный Аг – МОМР 32 Количество проб/%	Нативный антиген –Омр18 Количество проб/%	МОМР 32 - ОМР18 Количество проб/%	Нативный антиген – МОМР32- ОМР18 Количество проб/%
34/ (17,34%)	17/ (8,67%).	7 / (3,6%)	12/ (6,1%)

Исходя из данных таблицы 1 видно, что максимальное совпадение результатов зафиксировано в случае использования коммерческого нативного антигена и рекомбинантного антигена МОМР 32, такие совпадения отмечены при тестировании 34 сывороток крови (17,34%). В случае использования коммерческого и рекомбинантного антигена ОМР 18 было установлено совпадение в 17 случаев (8,67%).

При сравнении результатов взаимодействия антител в сыворотках с рекомбинантными и нативными антигенами совпадение увеличивалось до 12 позитивных образцов. Самое незначительное совпадение приходилось на вариант взаимодействия сывороток с двумя разными рекомбинантными антигенами, которые установлены всего в 7 случаях.

Таким образом анализ результатов серологического тестирования сывороток крови крупного рогатого скота с использованием рекомбинантных антигенов показал, что оба белка могут быть применены для диагностики кампилобактериоза. Однако установлена более высокая корреляция применения Омр18. Это свидетельствует о том, белок МОМР 32 представляет собой более перспективный антиген для использования в ИФА при серологической диагностике кампилобактериоза в силу того, что

использованный нативный антиген представляет собой смесь белков и не является специфичным. Работа по оптимизации условий для проведения ИФА на основе рекомбинантных белков продолжается.

Список литературы

- 1 Corcionivoschi, N., Gundogdu, O. (2021). Foodborne Pathogen *Campylobacter*. *Microorganisms*, 9(6), 6-9.
- 2 Shane, S.M., (2020). *Campylobacter* infection of commercial poultry *Revue Scientifique et Technique-Office Intern. des Epizoot*, 19(2), 376-385.
- 3 Walsh, TJ, Roilides E., Rex, JH, McGinnis, MR. (2011). Mucormycosis. *Trop. Med. Infect. Dis.*, 54(1), 597-602.
- 4 Kaakoush, NO, Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, HM, Man, SM. (2015). Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 28(3), 687-720.
- 5 Hernandez, L., Green, P. (2006). Extraintestinal manifestations of celiac disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 8(5), 383-389.
- 6 Kuwabara S., Yuki, N. (2013). Axonal Guillain-Barre syndrome Concepts and controversies. *Lancet Neurol.*, 12(12), 1180-1188.
- 7 Bessede, E., Delcamp, A., Sifre, E. (2011). New methods for detection of *campylobacters* in stool samples in comparison to culture. *J.Clin. Microbiol.*, 49(3), 941–944.
- 8 Мукантаев, КН, Боровиков, СН, Сыздыкова, АС, Жахина, АА. (2022). Использование рекомбинантных антигенов *Campylobacter jejuni* для получения специфических поликлональных антител. *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина*, 2(2), 146–155.