

УДК 619: 579. 843.95:616-078

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИТРА АНТИТЕЛ К *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* В СЫВОРОТКАХ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Е.С. Кострова¹, О.П. Бьядовская², Е.В. Пешкова³, О.В. Прунтова⁴

¹ младший научный сотрудник, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kostrova@arriah.ru

² ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

³ магистрант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир

⁴ главный эксперт, доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pruntova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Разработана тест-система на основе непрямого варианта ИФА для определения антител к *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови крупного рогатого скота разных половозрастных групп. В качестве антигена использовали липополисахаридный антиген, полученный фенольно-водной экстракцией из штамма *Mannheimia haemolytica* № 29696 из коллекции микроорганизмов АТСС. Представлены результаты сравнительного исследования сывороток крови крупного рогатого скота с помощью предложенной тест-системы и коммерческой тест-системы «*Mannheimia haemolytica* ELISA KIT» (BIOX, Бельгия). Определена относительная специфичность и чувствительность разработанного метода.

Ключевые слова: *Mannheimia haemolytica*, иммуноферментный анализ, липополисахаридный антиген, крупный рогатый скот.

UDC 619: 579. 843.95:616-078

DESIGN OF INDIRECT ELISA-BASED TEST-SYSTEM FOR DETERMINATION OF *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA* ANTIBODY TITRE IN BOVINE SERA

Ye.S. Kostrova¹, O.P. Bjadovskaya², Ye.V. Peshkova³, O.V. Pruntova⁴

¹ Junior Researcher, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: kostrova@arriah.ru

² Leading Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

³ Master's Student, FGBI «ARRIAH», Vladimir

⁴ Chief Expert, Doctor of Science (Biology), Professor, FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: pruntova@arriah.ru

SUMMARY

Indirect ELISA-based test-system was developed for determination of *Mannheimia haemolytica* antibody titre in sera from cattle of different age-sex groups. Lipopolysaccharide antigen (LPS-antigen) produced by phenol-water extraction from *Mannheimia haemolytica* strain No. 29696 (ATCC collection) was used as an antigen. Results obtained during the comparative examination of bovine sera using the proposed test-system and commercial test-system «*Mannheimia haemolytica* ELISA KIT» (BIOX, Belgium) are demonstrated. Relative specificity and sensitivity of the designed method were determined.

Key words: *Mannheimia haemolytica*, enzyme-linked immunosorbent assay, lipopolysaccharide antigen, cattle.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудители рода *Mannheimia* вызывают болезни сельскохозяйственных животных с различными клиническими проявлениями, поражающие респираторный, желудочно-кишечный и репродуктивный тракт, нередко заканчивающиеся летально. В результате ослабления организма, потеря прироста живой массы, потомства, потерь от падежа и вынужденного убоя больных

животных, а также затрат на проведение лечебно-профилактических и оздоровительных мероприятий наносится большой экономический ущерб животноводческой отрасли сельского хозяйства при инфекциях, вызываемых бактериями рода *Mannheimia* [1].

Род *Mannheimia* относится к семейству *Pasteurellaceae*, которое также включает роды *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus* и др. — возбу-

Таблица 1

Влияние состава блокирующих растворов на оптическую плотность (ОП) контрольных сывороток в непрямом варианте ИФА (n=3)

ОП контрольных сывороток в разведении 1:10	Блокирующий раствор					
	Обезжиренное сухое молоко, в концентрации			Сыворотка крови лошади, в концентрации		
	10%	3%	1%	10%	3%	1%
+ сыворотка	0,682±0,08	1,110±0,13	0,299±0,15	0,139±0,09	0,286±0,06	0,247±0,06
- сыворотка	0,154±0,08	0,096±0,13	0,068±0,05	0,05±0,03	0,05±0,03	0,05±0,03
P/N	4,43	11,56	4,39	2,78	5,72	4,94

телей болезней многих видов млекопитающих, птиц и человека всех возрастных групп.

К заболеваниям, вызываемым *Mannheimia haemolytica*, относятся респираторные инфекции крупного и мелкого рогатого скота, в том числе синдром «транспортной лихорадки» (легочный пастереллез), а также мастит коров и овец. *Mannheimia haemolytica* является комменсалом верхнего респираторного тракта животных, способствует энзоотиям пневмоний телят и при этом заболевании выступает как вторичная инфекция на фоне вирусных инфекций крупного рогатого скота [3, 5].

К манхеймиозам наиболее восприимчив младший крупного и мелкого рогатого скота. У телят признаки инфекции наблюдаются в первые дни жизни. *Mannheimia haemolytica* выявляют преимущественно в легких больных животных. По данным литературы известно, что этот условно-патогенный микроорганизм быстро размножается и за счет активации факторов патогенности вызывает острую фибринозную бронхопневмонию, приводящую к летальному исходу на фоне транзитной вирусной инфекции [1, 4].

Основным звеном в системе мер профилактики и борьбы с данным заболеванием является вакцинация. Изучение иммунобиологических свойств, антигенной активности и проведение технологического контроля на различных этапах производства вакцин предполагает определение уровня специфических антител в сыворотках крови крупного рогатого скота и лабораторных животных.

Целью данной работы явилась разработка тест-системы для определения титра антител к липополисахаридному антигену *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови крупного рогатого скота посредством непрямого варианта иммуноферментного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиген. В работе использовали культуру штамма *Mannheimia haemolytica* № 29696 из коллекции штаммов АТСС, выращенную на плотной питательной среде: 1,5% агар на основе перевара по Хоттингеру с добавлением 10% эритроцитов крови лошади (ХКЭ). Культивирование бактерий для получения биомассы проводили в аэробных условиях при 37 °С в течение 24 ч.

Липополисахаридный антиген (ЛПС-АГ) получали методом фенольно-водной экстракции по методике R.P. Darveau и R.E.W. Hancock с модификациями [2]. Раз-

ведения антигена готовили на 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе, pH 9,5–9,6.

Сыворотка крови. В качестве контроля использовали положительную и отрицательную контрольные сыворотки крови КРС коммерческой тест-системы «*Mannheimia haemolytica* ELISA KIT» (BIOX, Бельгия), специфичную к ЛПС-АГ *Mannheimia haemolytica*. Также в работе использовали сыворотки крови от разных половозрастных групп КРС из хозяйств различных регионов РФ.

Конъюгат. Применяли антивидовые иммуноглобулины против IgG КРС, конъюгированные с пероксидазой хрена (ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва).

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили с использованием коммерческой тест-системы «*Mannheimia haemolytica* ELISA KIT» (BIOX, Бельгия) согласно инструкции производителя и тест-системы Н-ИФА-«ВНИИЗЖ».

В результате оптимизации всех параметров была принята следующая схема непрямого варианта ИФА. Сенсibilизацию планшетов проводили путем внесения в каждую лунку по 50 мкл антигена в рабочем разведении в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе, pH 9,6. Планшет инкубировали 18–20 ч при температуре 4 °С. После удаления несвязавшихся компонентов, не отмывая, в лунки планшета вносили по 50 мкл 1 М трис-НСl с 0,15 М NaCl блокирующего буферного раствора (TBS), содержащего 3% обезжиренного сухого молока (Marvel), и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем планшеты трижды отмывали промыточным буферным раствором TBS, содержащим 0,05% Твин-20 (TBS-T). Пробы сывороток вносили в объеме 50 мкл в первые лунки планшета в разведении 1:10 и титровали методом последовательных двукратных разведений. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °С. Повторяли отмывку планшетов от несвязавшихся компонентов реакции, затем вносили антивидовой конъюгат в рабочем разведении 1:6000 и инкубировали в тех же условиях. После отмывки проводили индикацию реакции внесением субстрата АБТС. Через 15–20 мин после окрашивания реакцию останавливали путем внесения 50 мкл 1% раствора додецилсульфата натрия (ДСН). Измерение абсорбции исследуемых проб проводили на спектрофотометре «Sunrise» (TECAN, Австрия) при длине волны 405 нм. Все испытуемые пробы исследовали в трех повторностях.

Результаты анализа выражали в виде титра сыворотки. Титром сыворотки считали ее последнее разведение, при котором величина оптической плотности

Таблица 2
 Результаты исследования сывороток крови КРС в ИФА

Возрастная группа животных	«Mannheimia haemolytica ELISA KIT» (BIOX, Бельгия)		И-ИФА-«ВНИИЗЖ»	
	% позитивности ¹	результат	титр ²	результат
Телята, до выпойки молозива	13	отр.	1:10	отр.
	5,8	отр.	1:10	отр.
	0	отр.	1:10	отр.
	11	отр.	1:10	отр.
	5	отр.	1:10	отр.
	39	пол.	1:20	сомн.
Телята до месяца, после выпойки молозива	14	отр.	1:10–1:20	отр.
	69	пол.	1:160	пол.
	266	пол.	1:80	пол.
	206	пол.	1:40–1:80	пол.
	133	пол.	1:40	пол.
	38	пол.	1:20	сомн.
Телята 1–3 месяца	18	отр.	1:10	отр.
	24	пол.	1:40–1:80	пол.
	9	отр.	1:10	отр.
	26	пол.	1:80	пол.
	62	пол.	1:40–1:80	пол.
	32	пол.	1:20	сомн.
Телята 6–12 месяцев	154	пол.	1:40–1:80	пол.
	31	пол.	1:10	отр.
	15	отр.	1:10	отр.
	24	пол.	1:40	пол.
	14	отр.	1:10	отр.
	18	отр.	1:20	сомн.
Нетели 1–2 года	206	пол.	1:80	пол.
	86	пол.	1:80	пол.
	36	пол.	1:160	пол.
	72	пол.	1:40–1:80	пол.
	44	пол.	1:160	пол.
Коровы старше 2 лет	239	пол.	1:160	пол.
	88	пол.	1:80	пол.
	150	пол.	1:160	пол.
	237	пол.	1:80–1:160	пол.
	183	пол.	1:80–1:160	пол.
	203	пол.	1:160	пол.

¹ в коммерческом наборе «Mannheimia haemolytica ELISA KIT» (BIOX, Бельгия): <23% — результат отрицательный, ≥23% — результат положительный;

² титр в И-ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ»: 1:20–1:40 — сомнительный результат, ≥1:40 — положительный результат.

Таблица 3

Оценка относительной чувствительности и специфичности иммуноферментной тест-системы Н-ИФА-«ВНИИЗЖ»

Результаты ВЮХ	Н-ИФА ФГБУ «ВНИИЗЖ»		
	положит.	отр.	всего
Положительных проб	118/a	9/c	127/(a+c)
Отрицательных проб	9/d	47/b	56/(d+b)
Всего проб	127	56	n=183

a — истинно положительные результаты; b — истинно отрицательные результаты; c — ложноотрицательные результаты; d — ложноположительные результаты.

вдвое превосходила оптическую плотность в лунках с отрицательной контрольной сывороткой. Положительными считали пробы сывороток крови с титром 1:40 и выше.

Для обработки данных использовали компьютерную программу «Statistica 10».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка тест-системы для ИФА предполагает подбор оптимального содержания различных компонентов реакции, в том числе буферных растворов. После адсорбции антигена актуальным является блокирование остаточных свободных центров связывания лунок планшетов с целью уменьшения неспецифического взаимодействия с конъюгатом. Было проведено испытание ряда иммунологически индифферентных белков, применение которых позволило бы снизить уровень неспецифического взаимодействия. С этой целью использовали растворы обезжиренного сухого молока и сыворотки крови лошади в концентрациях 10, 3 и 1%. Результаты исследования приведены в табл. 1.

Полученные результаты показали, что значение P/N (отношение средних оптических плотностей положительной и отрицательной контрольных сывороток) было наибольшим (11,56) при использовании 3% раствора обезжиренного сухого молока, что позволило выбрать данный блокирующий буферный раствор как наиболее оптимальный.

С помощью разработанной тест-системы на основе непрямого варианта ИФА и коммерческой тест-системы провели исследование 270 полевых сывороток крови от КРС из хозяйств различных регионов Российской Федерации. Были проанализированы уровни содержания антител к *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови КРС различных возрастных групп. Результаты исследования сывороток крови частично представлены в табл. 2.

На основании данных, представленных в табл. 2, можно отметить, что антитела были выявлены у всех возрастных групп КРС, а наибольший уровень антител (1:80–160), определенный с помощью разработанной тест-системы, наблюдается у животных старше 12 месяцев.

С целью оценки относительной специфичности и чувствительности проводили сравнение результатов, полученных с применением разработанной тест-системы и при использовании коммерческого набора «*Mannheimia haemolytica* ELISA KIT» (BIOX, Бельгия). Результаты исследования 183 сывороток крови КРС с помощью двух тест-систем представлены в табл. 3.

Относительную чувствительность (Se) рассчитывали по формуле: $a/(a+c) \times 100\%$.

Относительную специфичность (Sp) определяли по формуле: $d/(b+d) \times 100\%$.

Таким образом, относительная чувствительность разработанной тест-системы составила 93%, а относительная специфичность — 84%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была разработана тест-система на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа для определения титра антител к липополисахаридному антигену *Mannheimia haemolytica* в сыворотках крови КРС. Показано, что разработанная тест-система имеет выраженную относительную чувствительность 93% и специфичность 84%.

Разработанная методика успешно прошла комиссионные испытания и применяется при проведении серологического мониторинга для определения уровня постинфекционных и поствакцинальных антител к *Mannheimia haemolytica* КРС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин [и др.]; ред. А.А. Сидорчук. — М.: КолосС, 2007. — 671 с.
2. Современное состояние проблемы респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, О.И. Гетманский, В.В. Думова [и др.] // Диагностика, профилактика и лечение болезней животных: сб. науч. тр. — Новосибирск, 2008. — С. 41–44.
3. Этиология бронхопневмоний крупного рогатого скота на молочных комплексах / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, О.В. Семенова [и др.] // Ветеринария. — 2014. — № 4. — С. 7–11.
4. Darveau R.P., Hancock R.E.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains // J. Bacteriol. — 1983. — Vol. 155, № 2. — P. 831–838.
5. Singh K.J., Ritchey W., Confer A.W. *Mannheimia haemolytica*: Bacterial-host interaction in bovine pneumonia // Vet. Pathol. — 2010. — Vol. 48, № 2. — P. 338–348.
6. Yates W.D. Interaction between viruses and bacteria in bovine respiratory disease // Can. Vet. J. — 1984. — Vol. 25. — P. 37–41.