

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ СЕРОДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЬЮГАТА КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА С ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ *BRUCELLA ABORTUS*

Сотников Д. В.

Институт биохимии им. А. Н. Баха Российской академии наук, Москва, Россия (119071, Москва, Ленинский пр., 33, стр.2), e-mail: sotnikov-d-i@mail.ru

В работе рассматривается метод иммунохроматографического анализа, примененный для серодиагностики (определения специфических антител) бруцеллеза крупного рогатого скота. Отличительной особенностью предлагаемого метода является использование конъюгата коллоидного золота с липополисахаридом (ЛПС) *Brucella abortus* и нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованным ЛПС *Brucella abortus* (а не конъюгата антивидовых антител с коллоидным золотом, как в традиционных иммунохроматографических серодиагностических системах). Благодаря наличию у антител нескольких валентностей происходит связывание ими одновременно меченого золотом и иммобилизованного на мембране ЛПС и формирование окрашенной полосы в аналитической зоне. Данный подход позволяет детектировать минимальные концентрации специфических антител на фоне более чем 90 %-ного избытка неспецифических, устраняя мешающее влияние последних на результаты анализа. Эффективность подхода подтверждена при тестировании группы из 39 коров. Показана корреляция результатов, получаемых предлагаемым методом и традиционным иммуноферментным анализом.

Ключевые слова: иммунохроматография, липополисахарид, *Brucella abortus*.

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC SERODIAGNOSYS OF CATTLE BRUCELLOSIS WITH THE USE OF COLLOIDAL GOLD – *BRUCELLA ABORTUS* LIPOPOLYSACCHARIDE CONJUGATE

Sotnikov D. V.

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia (119071, Moscow, Leninsky prospect, 33, building 2), e-mail: sotnikov-d-i@mail.ru

In this paper the method of immunochromatographic analysis applied for serodiagnosis (detection of specific antibodies) of cattle brucellosis is studied. A distinctive feature of the proposed method is the use of colloidal gold – *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) conjugate and the nitrocellulose membrane with immobilized *Brucella abortus* LPS (instead of antispecies antibodies used in traditional immunochromatographic test-systems for serodiagnosis). Due to several antibody valences a simultaneous binding between gold-labeled LPS and LPS immobilized on a membrane strip with the formation of colored area in analytical zone occurs. This approach allows the detection of the minimum concentration of specific antibodies against more than 90% excess of nonspecific antibodies eliminating the influence of the latter on the assay results. The efficiency of the proposed approach was confirmed by the testing of 39 cows. The results of the proposed assay correlate well with the data of traditional immunoenzyme assay.

Key words: immunochromatography, lipopolysaccharide, *Brucella abortus*.

Введение

Используемые в настоящее время методы диагностики инфекционных заболеваний направлены в основном на определение возбудителя заболевания и его антигенов либо на выявление иммунного ответа инфицированного организма на антигены возбудителя. К последнему типу относятся методы серодиагностики – определения специфических антител в крови. Несмотря на то, что современные аналитические методы обеспечивают крайне низкий предел обнаружения, в ряде случаев серодиагностический подход оказывается предпочтительным. Гуморальный иммунный ответ всегда сопровождается значительным

повышением концентрации специфических антител в крови, делая сыворотку крови универсальным материалом для диагностики разнообразных инфекционных заболеваний [1].

Серодиагностический подход наиболее оправдан при первичных обследованиях, а поскольку для массового скрининга решающее значение имеет скорость получения результата, представляется перспективным сочетание серодиагностики с таким простым и экспрессным методом, как иммунохроматографический анализ (ИХА). Результат ИХА может быть получен за 10–15 мин непосредственно на месте отбора пробы, без дополнительного оборудования и привлечения высококвалифицированного персонала.

Существенным ограничением для применения иммунохроматографии в серодиагностике является необходимость без разделения реагентов выявлять специфические антитела на фоне многократного избытка неспецифических антител. В настоящей работе на примере тест-системы для определения специфических антител против липополисахарида (ЛПС) *Brucella abortus* рассматривается подход, позволяющий обойти данное ограничение.

Материалы и методы

1. Реагенты. В работе использовались кроличьи (RABIss) антитела против иммуноглобулинов крупного рогатого скота производства ООО «Имтек» (Россия), твин-20, азид натрия – «Sigma» (США), золотохлористоводородная кислота – «Fluka» (Германия), бычий сывороточный альбумин (БСА) – «MP Biomedicals» (США). Для изготовления иммунохроматографических тест-систем использовали набор mdi Easypack («Advanced Microdevices», Индия). Панель сывороток коров и липополисахарид *Brucella abortus* были предоставлены Национальным центром биотехнологии Республики Казахстан (Астана, Казахстан). Наличие или отсутствие противобруцеллезных антител в сыворотках было подтверждено методом иммуноферментного анализа. ЛПС получен методом водно-фенольной экстракции [7].

Все соли были аналитической или химической чистоты. Воду для приготовления растворов очищали на установке MilliQ («Millipore», США).

2. Иммуноферментная детекция специфических антител к ЛПС *Br. abortus* в сыворотках крупного рогатого скота. Сорбцию препарата ЛПС в лунках 96-луночного микропланшета «Greiner» (Германия) осуществляли в течение ночи при 4 °С из 100 мкл раствора с концентрацией 1 мкг/мл в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9,6. Микропланшет четырехкратно отмывали 50 мМ К-фосфатным буфером, pH 7,4, с 0,1 М NaCl и 0,05 % Тритона X-100 (PBST), после чего в лунки вносили по 100 мкл сывороток, разбавленных PBST от 1:100 до 1:100,000 с шагом 2, и инкубировали 1 час при 37 °С. Затем микропланшет повторно отмывали, добавляли по 100 мкл раствора в PBST моноклональных антител против IgG крупного рогатого скота, меченных пероксидазой хрена (160 нг/мл), и инкубировали 1

час при 37 °С. После отмывки микропланшета (трижды PBST и один раз – дистиллированной водой) определяли пероксидазную активность связавшейся с носителем ферментной метки. Для этого в лунки микропланшета вносили по 100 мкл субстратного раствора АБТС (0,4 мг/мл) в 50 мМ Na-ацетатном буфере, рН 4,5, с 0,01% H₂O₂, инкубировали 15 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность при 405 нм (ОП405).

3. Получение коллоидного золота [6]. К 97,5 мл воды добавляли 1,0 мл 1 %-ного раствора золотохлористоводородной кислоты. Смесь доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1,5 мл 1 %-ного раствора цитрата натрия. Кипятили 30 мин, затем охлаждали до комнатной температуры.

4. Нанесение реагентов на иммунохроматографические мембраны. Конъюгат коллоидного золота с ЛПС наносили на стекловолоконную мембрану в разведении, соответствующем ОП520=2,0, в объеме 11 мкл на 1 см полосы с помощью диспенсера IsoFlow фирмы «Imagene Technology» (США).

Для формирования аналитической зоны использовали препарат ЛПС *Br. abortus*. На 1 см полосы наносили 2 мкл препарата (1,0 мг/мл в дистиллированной воде).

5. Изготовление иммунохроматографических тест-систем [4, 5]. Полученные подложки и рабочие мембраны сушили на воздухе при 20–22 °С не менее 20 ч. Собирали мультимембранный композит, из которого получали полосы шириной 3,5 мм, используя автоматический гильотинный нарезчик Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США). Тест-полоски помещали в пластиковые кассеты и герметично упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги с силикагелем в качестве осушителя с помощью запаивателя с миниконвейером FR-900 (“Wenzhou dingli packing machinery”, Китай).

Результаты и обсуждение

Традиционная схема иммунохроматографического анализа, применяемая для серодиагностики, предполагает взаимодействие всех антител, содержащихся в пробе, с конъюгатом коллоидного золота и реагента для связывания антител (обычно в качестве такого реагента используют антивидовые антитела, белок А *Staphylococcus aureus* или белок G *Streptococcus* spp.). После связывания части иммуноглобулинов в пробе конъюгат диффундирует по тест-полоске, и в аналитической зоне небольшая часть связанных иммуноглобулинов, специфичных к патогену, взаимодействует с иммобилизованным в аналитической зоне антигеном. Таким образом, сигнал ИХА (степень связывания окрашенной метки в аналитической зоне) в этом случае зависит не только от концентрации специфических антител, но и от общего содержания иммуноглобулинов в пробе, что не является диагностически значимым параметром и негативно сказывается на достоверности

диагностики. Этот принцип лежит в основе разработанных на сегодняшний день ИХА тестов для серодиагностики бруцеллеза [2, 3].

В настоящей работе использован альтернативный подход, основанный на применении поливалентности антител. В данном формате ИХА коллоидное золото конъюгируется с тем же антигеном, который иммобилизован в аналитической зоне. Специфические антитела взаимодействуют разными валентностями с молекулами антигена, иммобилизованными на разных поверхностях: коллоидного золота и рабочей мембраны. В таком случае во взаимодействии принимают участие только специфические антитела.

В качестве антигена был использован ЛПС *Br. abortus*. Для определения предела обнаружения иммунохроматографических тестов использовали моноклональные антитела против ЛПС *Brucella abortus*. Чувствительность тестов составила 5 мкг/мл антител – как в буферном растворе, так и в сыворотке крупного рогатого скота, несмотря на то, что сыворотка содержит более 5 мг/мл общих иммуноглобулинов (рис. 1). Таким образом, предложенная тест-система позволяет выявлять менее 0,1 % специфических антител в пробе.

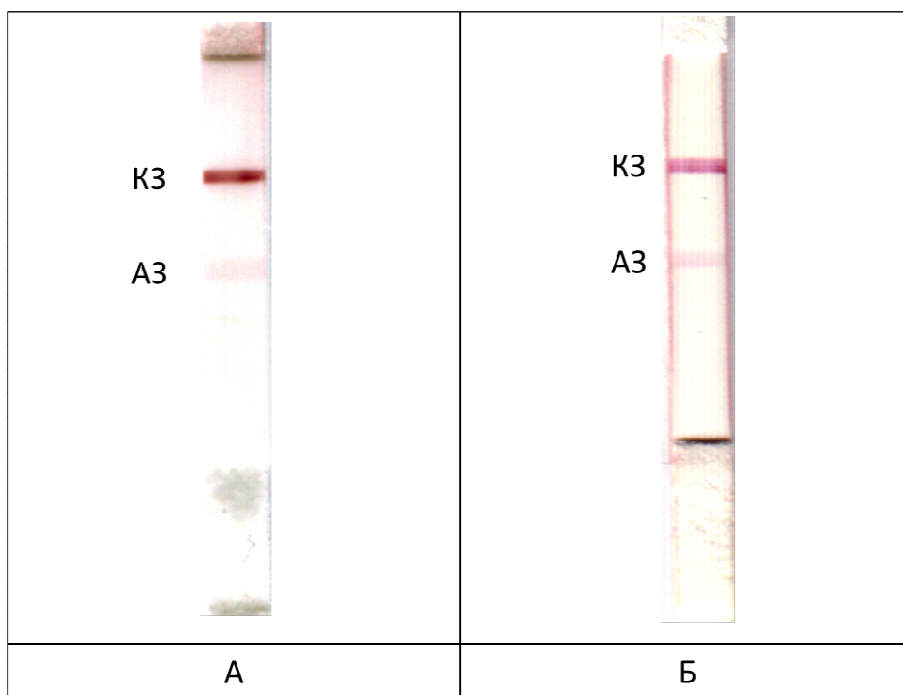


Рис. 1. Иммунохроматографическое выявление специфических антител (5 мкг/мл): А – в фосфатном буфере (рН 7,4); Б – в сыворотке крови крупного рогатого скота. АЗ – аналитическая зона, КЗ – контрольная зона

Разработанный тест был испытан на выборке из 39 коров, больных бруцеллезом. Данные иммунохроматографического тестирования сравнивали с данными иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве унифицированной характеристики количества специфических антител в сыворотке использовали величину ее разведения, которая на асимптотической кривой титрования в ИФА соответствует оптической плотности

0,7. Полученные результаты приведены в табл. 1. Как видим, данные, полученные двумя методами, хорошо согласуются друг с другом.

Таблица 1. Результаты тестирования сывороток коров методами ИФА и ИХА

№	ИФА, разведение	ИХА
Положительные сыворотки		
1	1750	+
2	30000	+++
3	2150	+
4	3250	+
5	2900	+
6	4750	+
7	1900	+
8	25000	+++
9	4700	+
10	7000	++
11	12000	++
12	6000	+
13	1000	+
14	1250	+
15	2000	+
16	30000	+++
17	2600	+
18	30000	+++
19	10500	++
20	3750	+
21	7250	+
22	35000	+++
23	19000	++
24	1750	+
25	6250	+
26	2600	+
27	4600	+

Отрицательные сыворотки		
28	750	-
29	750	-
30	300	-
31	750	-
32	0	-
33	250	-
34	750	-
35	300	-
36	600	-
37	400	-
38	250	-
39	250	-

Выводы

В результате проведенных исследований разработана иммунохроматографическая тест-система для серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота с нетрадиционным форматом анализа, который можно рассматривать как эффективную альтернативу применяемым на сегодняшний день подходам. Детекция комплексов (иммобилизованный на мембране антиген) – антитело – (конъюгированный с коллоидным золотом антиген) исключает негативное влияние неспецифических иммуноглобулинов в сыворотке и тем самым повышает достоверность серодиагностики.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», государственный контракт от 12 марта 2012 г. № 11.519.11.2046).

Список литературы

1. Резникова Л. С., Эпштейн-Литвак Р. В., Леви М. И. Серологические методы исследования при диагностике инфекционных болезней. – М.: Медгиз, 1962. – 371 с.
2. Abdoel T., Dias I. T., Cardoso R., Smits H. L. Simple and rapid field tests for brucellosis in livestock // Vet. Microbiol. – 2008. – Vol. 130, № 3–4. – P. 312-319.
3. Bronsvort B. M. C., Koterwas B., Land F., Handel I. G., Tucker J., Morgan K. L., Tanya V. N., Abdoel T. H., Smits H. L. Comparison of a flow assay for brucellosis antibodies with the reference cELISA test in West African *Bos indicus* // PLoS One. – 2009. – Vol. 4, № 3–4. – P. e5221.

4. Byzova N. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V., Eremin S. A., Dzantiev B. B. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk // *Talanta*. – 2010. – Vol. 81, № 3. – P. 843-848.
5. Byzova N. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V., Eremin S. A., Sveshnikov P. G., Dzantiev B. B. Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products // *Anal. Chim. Acta*. – 2011. – Vol. 701, № 3–4. – P. 209-217.
6. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Phys. Sci.* – 1973. – Vol. 241. – P. 20-22.
7. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure // Whistler R. L., Wolfan M.L., editors. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Vol. 5. – New York: Academic Press, 1965. – P. 83-91.

Рецензенты:

Капельянец Арсений Сумбатович, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией Института биохимии им. А. Н. Баха РАН, г. Москва.

Топунов Алексей Федорович, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией Института биохимии им. А. Н. Баха РАН, профессор Московского государственного университета пищевых производств, г. Москва.