

УДК 619:616.98

## РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНОГО АНТИГЕНА И КЛЕТОК ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2012 г. Н. А. Бызова\*, А. В. Жердев\*, С. З. Ескендирова\*\*, К. К. Балтин\*\*, Г. Б. Унышева\*\*,  
К. К. Муканов\*\*, Е. М. Раманкулов\*\*, Б. Б. Дзантиев\*

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

\*\*Национальный центр биотехнологии РК, Астана, Казахстан, 010000

Поступила в редакцию 16.04.2012 г.

Разработан экспресс-метод детекции поверхностного липополисахаридного антигена и клеток возбудителя бруцеллеза крупного рогатого скота, представляющий собой иммунохроматографический анализ в “сэндвич”-формате. Контакт пробы и тест-полоски с нанесенными иммунореагентами инициирует движение жидкости по мембранным компонентам тест-полоски, иммунохимические взаимодействия и формирование окрашенных зон. Показано, что данный метод позволяет за 10 мин определять липополисахаридный антиген клеточной стенки возбудителя бруцеллеза в концентрациях до 10 нг/мл и клетки *Brucella abortus* в концентрациях до  $10^6$  кл./мл ( $5 \times 10^4$  кл. в пробе). Подтверждена специфичность иммунодетекции. Разработанная тест-система может быть использована при внелaborаторной экспресс-диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота.

Во многих странах бруцеллез наносит значительный экономический ущерб, обусловленный заражением сельскохозяйственных животных и частыми случаями инфицирования людей [1, 2]. Высока актуальность этой проблемы, в частности, для России и Казахстана [3–6].

Одним из основных направлений в борьбе с бруцеллезом является своевременное выявление очагов инфекции, эффективность которого связана с достоверной, оперативной и информативной лабораторной диагностикой заболевания. Для диагностики бруцеллеза в настоящее время используют бактериологические, биологические, молекулярные и серологические методы, каждый из которых обладает своими достоинствами и ограничениями [7].

Бактериологический метод при положительном результате обеспечивает наиболее достоверную лабораторную диагностику бруцеллеза. Дополнительное преимущество метода заключается в возможности идентификации возбудителя до биовара, что позволяет установить источник инфекции и наметить наиболее эффективные противоэпидемические и профилактические мероприятия. Вместе с тем недостатками метода являются длительность получения результатов, трудоемкость и опасность для персонала, низкая производительность и другие факторы [7, 8].

Биологический метод основан на избирательном накоплении возбудителя бруцеллеза в организме восприимчивых к нему лабораторных животных при парентеральном введении исследуемого материала, в том числе загрязнен-

ного посторонней микрофлорой. Метод несколько более чувствителен, чем бактериологический, при работе с высоковирулентными штаммами бруцелл, но малопригоден при исследовании материала, содержащего возбудитель с ослабленной вирулентностью. В остальном биологический метод сохраняет недостатки бактериологического.

Для детекции и идентификации бруцелл и лабораторного подтверждения диагноза используют также метод полимеразной цепной реакции, позволяющий в течение 5–6 ч определить наличие специфической последовательности ДНК бруцелл в пробах [9]. К ограничениям метода следует отнести длительность, повышенные требования к условиям проведения лабораторного тестирования и квалификации персонала.

Серологические методы позволяют фиксировать наличие антигенсодержащего материала или антител к нему, не прибегая к изоляции болезнетворного агента. В отличие от бактериологического и биологического методов, достоверность которых вытекает из факта выделения бруцелл, серологические тесты представляют доказательства присутствия в исследуемом материале искомого агента на основе специфического взаимодействия антиген–антитело. Важным преимуществом этих методов перед первыми является возможность детекции не только корпускулярных, но и субкорпускулярных и растворимых антигенов (т.е. циркулирующих в организме или выводимых из него фрагментов возбудителя). К настоящему времени предложены и используются разнообразные серологические тесты, позволяю-

щие выявлять как антигены бруцелл, так и специфические антитела: реакция агглютинации [10, 11], реакция связывания комплемента [12], иммунодиффузия [10], иммунофлуоресцентный анализ [13], иммуноэлектрофорез [14], радиоиммунный анализ [15], иммуноферментный анализ (ИФА) [16–18], дот-иммуноанализ [19]. Многообразие серологических методов обусловлено, главным образом, стремлением повысить их достоверность и информативность. Исходя из этого, обычно используют не один серологический тест, а несколько дополняющих друг друга тестов [20].

Выбор оптимального формата иммуноанализа основывается прежде всего на его экспрессности и пределе детекции. Исходя из этих критериев, несомненными преимуществами обладают активно разрабатываемые в последнее время иммунохроматографические методы анализа [21]. При проведении иммунохроматографии контакт пробы с тест-полоской инициирует движение реагентов по мембранам тест-полоски и все происходящее при этом специфические реакции. Вызываемое окрашивание определенных зон тест-полоски позволяет сделать вывод о результатах тестирования, в том числе исходя из визуальной оценки интенсивности окрашивания. Таким образом, иммунохроматография обеспечивает возможность проведения быстрого (5–15 мин) и нетрудоемкого анализа, который может быть реализован непосредственно на месте отбора пробы [22]. Для документирования результатов иммунохроматографии и при необходимости их последующей количественной оценки могут быть дополнительно использованы различные портативные средства видеорегистрации – как специализированные устройства, так и серийные сканеры и мобильные телефоны [23, 24].

Цель исследования – разработка и характеристика экспрессного иммунохроматографического анализа (ИХА) для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота (КРС), основанного на определении в биоматериале клеток возбудителя бруцеллеза *Brucella abortus* и его специфического антигена – липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** В работе применяли антитела козы (GAMIss), кролика (RAMIss) и овцы (SAMIss) против IgG мыши и антитела овцы (SARIss) против IgG кролика (“Имтек”, Россия), антитела козы (GAMI) против IgG мыши (“Arista Biologicals”, США), конъюгат антител быка против IgG мыши с пероксидазой (“Медгамал”, Россия), трис, Тритон X-100, дигидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, N-гидроксисукцинимидный эфир биотина, цитрат натрия, азид натрия, фетальную сыворотку КРС (“Sigma”, США), золотохлори-

стоводородную кислоту (“Fluka”, Германия), диметилсульфоксид (ДМСО), Твин-20, БСА (“MP Biomedicals”, Великобритания). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи, органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

Растворы для получения коллоидного золота (КЗ) и его конъюгатов готовили на деионизированной воде (18.2 МΩ см при 25°C, система Simplicity, “Millipore”, США).

ИФА проводили в 96-луночных прозрачных полистироловых микропланшетах Costar 9018 (“Corning Costar”, США). Для изготовления иммунохроматографических тест-полосок использовали наборы mdi Easypack (“Advanced Microdevices”, Индия), включающие рабочую мембрану, закрепленную на твердой основе, подложку для коллоидного конъюгата, мембрану для нанесения пробы, конечную адсорбирующую мембрану и ламинирующую защитную пленку.

В работе также использовали коммерческий препарат единого бруцеллезного антигена *Brucella abortus* 19 производства НПО “Антиген” Алматы, Казахстан (концентрация клеток  $10^{10}$  кл./мл).

**Выращивание культуры клеток *B. abortus* 19.** Культуру клеток *B. abortus* 19 выращивали на эритроцит-агаре при 37°C в течение 3–4 сут. Клетки смывали стерильным физиологическим раствором, pH 7.0–7.2, фильтровали и прогревали при 80°C в течение 1 ч для инактивации бруцелл. Для отделения бактериальной массы взвесь центрифугировали при 3000 г в течение 10–15 мин. Надосадочную жидкость отделяли, а осадок использовали для получения ЛПС клеточной стенки бруцелл.

**Получение бактериальных препаратов.** При характеристике специфичности тест-систем были использованы клетки *B. suis*, *Yersinia enterocolitica* O:9 R, O:9 S и 287, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae Inaba*, *Salmonella enteritidis yena*, *S. typhimurium* TA 100, *Escherichia coli* 565, *E. coli* 113-3, *Shigella sonne*, *S. flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii* в концентрациях  $10^9$ – $10^{10}$  кл./мл, подвергнутые термообработке при 80°C в течение 1 ч.

**Выделение ЛПС антигена *B. abortus*.** ЛПС бруцелл получали методом водно-фенольной экстракции. Инактивированную клеточную массу *B. abortus* 19 экстрагировали водно-фенольной смесью (объемное соотношение вода–фенол = 1 : 1) 15 мин при 70°C, после охлаждения центрифугировали при 1100 g в течение 1 ч. Отделяли фенольный слой, повторяли экстракцию в таком же режиме, объединяли фенольные фазы и диализовали их против воды. Содержание углеводов определяли фенольно-серным методом [25], а затем концентрировали препарат до 1 мг/мл. К полученному препарату антигена добавляли азид

натрия до конечной концентрации 0.1% и хранили при 2–4°C.

**Получение моноклональных антител.** Иммунизация включала 5 внутривенных инъекций препарата ЛПС *B. abortus* 54 мышам BALB/c (первая – в смеси с полным адьювантом Фрейнда и 4 последующих – в 50 мМ К-фосфатном буфере, рН 7.4, с 0.1 М NaCl, ФБС). Дозы иммуногена на животное составляли 100 мкг. Титр специфических антител определяли методом ИФА. Для получения иммунных спленоцитов использовали мышей с максимальным титром.

Через 3 сут после последней иммунизации выделяли спленоциты и смешивали их с миеломными клетками линии X63-Ag-8.653. Селекцию гибридом проводили в среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Для культивирования клеток использовали среду RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки плода КРС.

Начиная с 10 сут после слияния клеток, супернатанты лунок с визуализированным ростом проверяли методом непрямого твердофазного ИФА на наличие гибридом, продуцирующих антитела против ЛПС бруцелл. Отобранные гибридомы наращивали *in vitro* и в виде асцитных опухолей в перитонеальной полости мышей BALB/c, получивших за 1 нед до введения клеток внутривенную инъекцию 1 мл пристана. Гибридомы вводили в 0.5–1 мл среды RPMI-1640 в концентрации  $(1-4) \times 10^6$  кл. на одно животное. Через 10–20 сут выделяли асцитную жидкость.

Полученный штамм гибридных клеток 7F10 депонирован в Республиканской коллекции микроорганизмов Казахстана, регистрационный номер С-РКМ 0271.

Штамм гибридных клеток БИМА получен при иммунизации мышей поли-Б антигеном *B. melitensis* B115 [26].

Очистку иммуноглобулинов проводили трехкратным осаждением сульфатом аммония. Конечные препараты иммуноглобулинов хранили при 4°C в виде осадков под сульфатом аммония.

Моноклональные антитела 7F10 относились к классу IgG, подклассу 1, антитела БИМА – к классу IgG, подклассу 2a. Константа связывания антител 7F10 по отношению к ЛПС бруцелл составляла  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , константа связывания антител БИМА –  $7.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ .

**Биотинилирование антител [27].** 200 мкл раствора антител в ФБС (100 мкмоль) смешивали с раствором N-гидроксисукцинимидного эфира биотина в ДМСО (1 ммоль) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре и непрерывном перемешивании. Избыток непрореагировавших низкомолекулярных реагентов удаляли диализом против ФБС.

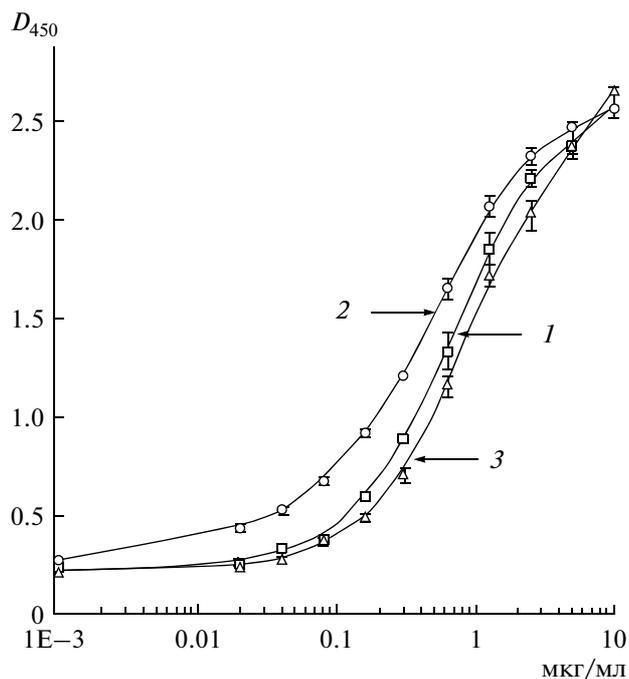
**“Сэндвич”-ИФА ЛПС.** Антитела 7F10 или БИМА в концентрации 3 мкг/мл в ФБС иммобилизовали из объема 100 мкл в лунках микропланшета в течение ночи при 4°C. Затем четырехкратно отмывали микропланшет ФБС с 0.05% Тритона X-100 (ФБСТ). Далее в лунки микропланшета вносили по 50 мкл раствора ЛПС (диапазон концентраций от 40 нг до 20 мкг/мл) в ФБСТ и добавляли по 50 мкл биотинилированных специфических антител в концентрации 1 мкг/мл в ФБСТ. Микропланшет инкубировали 1 ч при 37°C, затем четырехкратно отмывали ФБСТ, добавляли в лунки по 100 мкл стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (разведение 1 : 5.000 в ФБСТ), и снова инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки (трижды ФБСТ и один раз – дистиллированной водой) определяли пероксидазную активность связавшейся с носителем ферментной метки. Для этого в лунки микропланшета вносили по 100 мкл 0.4 мМ раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в 40 мМ Na-цитратном буфере, рН 4.0, с 3 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли D<sub>450</sub>.

**Получение КЗ цитратным методом [28].** К 97.5 мл деионизованной воды добавляли 1.0 мл 1%-ного раствора H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1.5 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили 25 мин, затем охлаждали и хранили при 4–6°C.

**Просвечивающая электронная микроскопия.** Препараты КЗ наносили на сеточки (300 меш., “Pelco International”, США), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформала, растворенного в хлороформе. Снимки получали на электронном микроскопе CX-100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 3.300.000. Фотографии в цифровой форме анализировали в программе Image Tool.

**Получение конъюгатов КЗ с антителами.** Предварительную характеристику связывания антител с КЗ проводили согласно [27]. С этой целью к 0.1 мл растворов антител в воде (концентрацию варьировали от 5 до 250 мкг/мл) добавляли по 1.0 мл раствора КЗ (D<sub>520</sub> = 1.0), перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробу добавляли по 0.1 мл 10%-ного NaCl, перемешивали и через 10 мин измеряли D<sub>580</sub>.

Перед конъюгацией с КЗ антитела диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ трис-HCl буфера, рН 8.5, в течение 2 ч при 4°C. К раствору КЗ (D<sub>520</sub> = 1.0) добавляли 0.2 М K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до достижения рН 8.5 и вносили в раствор антител выбранной концентрации. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивании, после чего вносили БСА до конечной концентрации 0.25%. Частицы КЗ с иммобилизованными на них антителами отделяли от непрореагировавших



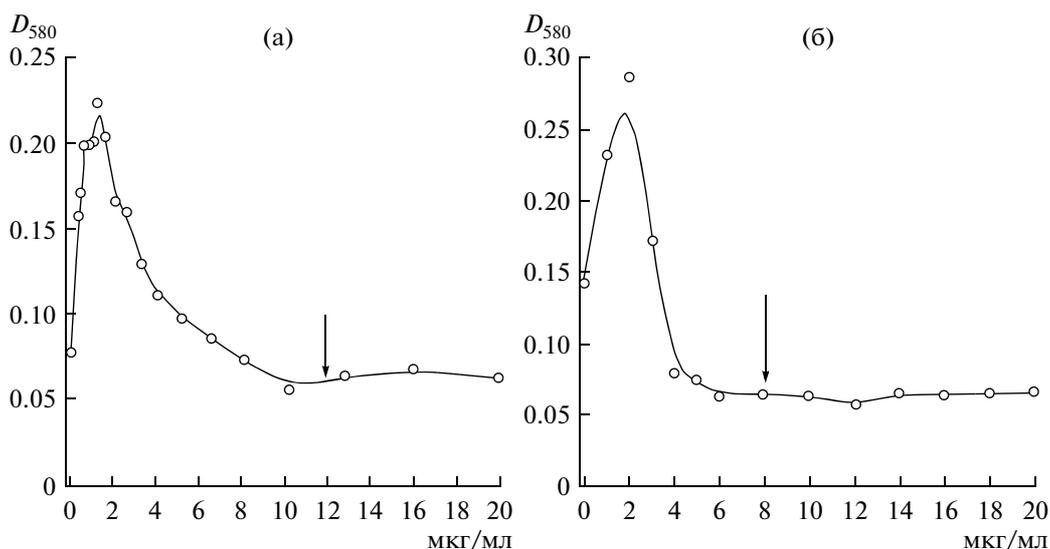
**Рис. 1.** Определение ЛПС (мкг/мл) *B. abortus* в буфере методом «сэндвич»-ИФА. 1 – 7F10 на фазе, конъюгат 7F10–биотин в растворе, 2 – 7F10 на фазе, конъюгат БИМА–биотин в растворе, 3 – БИМА на фазе, конъюгат 7F10–биотин в растворе.

модействовавших антител центрифугированием при 8000 г в течение 30 мин. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в ФБС, содержащем 0.25% БСА. При необходимости длительного хранения к полученному продукту до-

бавляли азид натрия до конечной концентрации 0.02%.

**Изготовление иммунохроматографических тест-систем.** Нанесение реагентов на мембраны, входящие в состав тест-системы, проводили с использованием автоматического диспенсера IsoFlow (“Imagene Technology”, США). Конъюгат КЗ с антителами 7F10 наносили на подложку в разведении, соответствующем  $D_{520} = 2.0$  (32 мкл на 1 см ширины подложки). Для формирования аналитической зоны использовали антитела 7F10 или БИМА (0.5 мг/мл в ФБС), контрольной зоны – антитела козы против IgG мыши (GAMI, GAMIss, RAMIss, SAMIss; 0.25 мг/мл в ФБС). Растворы стабилизировали и наносили по 2.0 мкл на 1 см ширины рабочей мембраны. Полученные подложки и рабочие мембраны сушили на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч. Собирали мультимембранный композит, из которого получали полоски шириной 3.5 мм, используя автоматический гильотинный нарезчик Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США). Эти тест-полоски с силикагелем в качестве осушителя герметично упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги с помощью запаивателя с миниконвейером FR-900 (“Wenzhou dingli packing machinery”, Китай). Нарезку и упаковку проводили при 20–22°C в специальном помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%. Упакованные тест-полоски хранили при 20–22°C.

**ИХА и регистрация результатов.** Анализ проводили при комнатной температуре. Вскрывали пакет, извлекали тест-полоску и в вертикальном положении ее нижний конец погружали на 1 мин в



**Рис. 2.** Определение концентраций (мкг/мл) специфических моноклональных антител 7F10 (а) и БИМА (б) к антигенам *B. abortus*, используемых для конъюгации с коллоидным золотом. Нулевой уровень  $D_{580}$  соответствует КЗ без антител и без добавления 10%-ного NaCl. Стрелками указаны концентрации антител, оптимальные для получения стабильных конъюгатов.

аликвоту пробы (50 мкл), после чего помещали тест-полоску на горизонтальную поверхность. Через 10 мин после начала анализа контролировали результат, получая цифровое изображение тест-полосок на сканере CanoScan LiDE 90 (“Canon”) и рассчитывая интегральную интенсивность окрашивания контрольной и аналитической зон, как описано в работе [29].

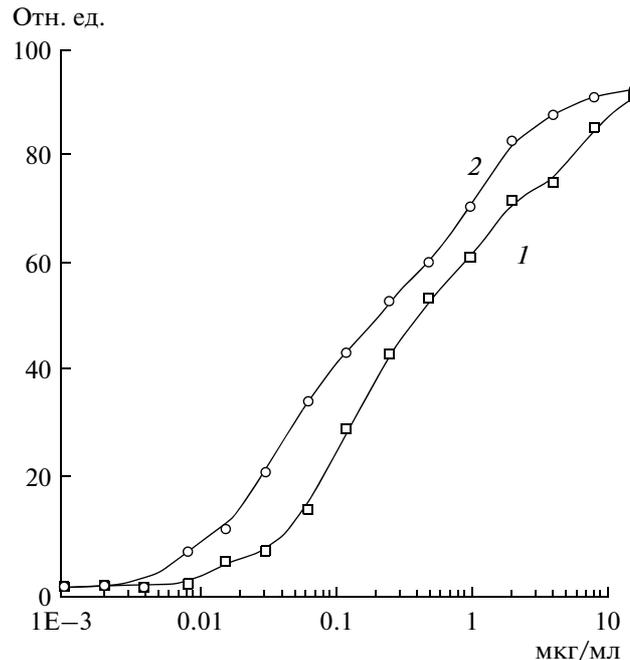
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор формата иммуноанализа.** Поскольку и клетки возбудителя бруцеллеза, и встречающиеся в биоматериале антигенные препараты – фрагменты клеточной стенки *B. abortus* являются поливалентными антигенами, для высокочувствительной иммунодетекции оптимальна реализация “сэндвич”-формата иммуноанализа, основанного на образовании в ходе анализа комплексов иммобилизованное антитело–антиген–меченое антитело. Известно, что данный формат характеризуется низким пределом обнаружения по сравнению с альтернативными форматами, а качественная оценка результатов в случае иммунохроматографии сводится к заключению о наличии или отсутствии окрашивания в аналитической зоне тест-полоски [30, 31].

При проведении “сэндвич”-ИХА анализируемый образец абсорбируется поглощающим участком тест-полоски. При наличии в образце антигена он вступает в реакцию с нанесенными на стартовую зону тест-полоски специфическими антителами, меченными коллоидным золотом. Образовавшийся комплекс антиген–антитело вступает в реакцию со специфическими антителами, иммобилизованными в аналитической зоне тест-полоски. Таким образом, положительному результату анализа соответствует образование окрашенной линии в аналитической зоне. В случае отсутствия антигена в анализируемом образце окрашивания в аналитической зоне не наблюдается. В контрольной зоне тест-полоски нанесены антитела против IgG мыши, поэтому там образуется окрашенный комплекс независимо от наличия антигена в образце.

**Характеристика антител.** Для реализации “сэндвич”-иммуноанализа были использованы моноклональные антитела против ЛПС *B. abortus* 7F10 и БИМА. Антигенсвязывающие свойства этих антител были охарактеризованы “сэндвич”-методом ИФА. Были сопоставлены четыре варианта ИФА, отличающиеся по выбору антител для иммобилизации на твердой фазе и мечения ферментом. Для введения метки в образующиеся иммунные комплексы использовали биотинилирование антител в сочетании с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза.

Для достижения максимальной чувствительности анализа оптимизировали условия проведе-

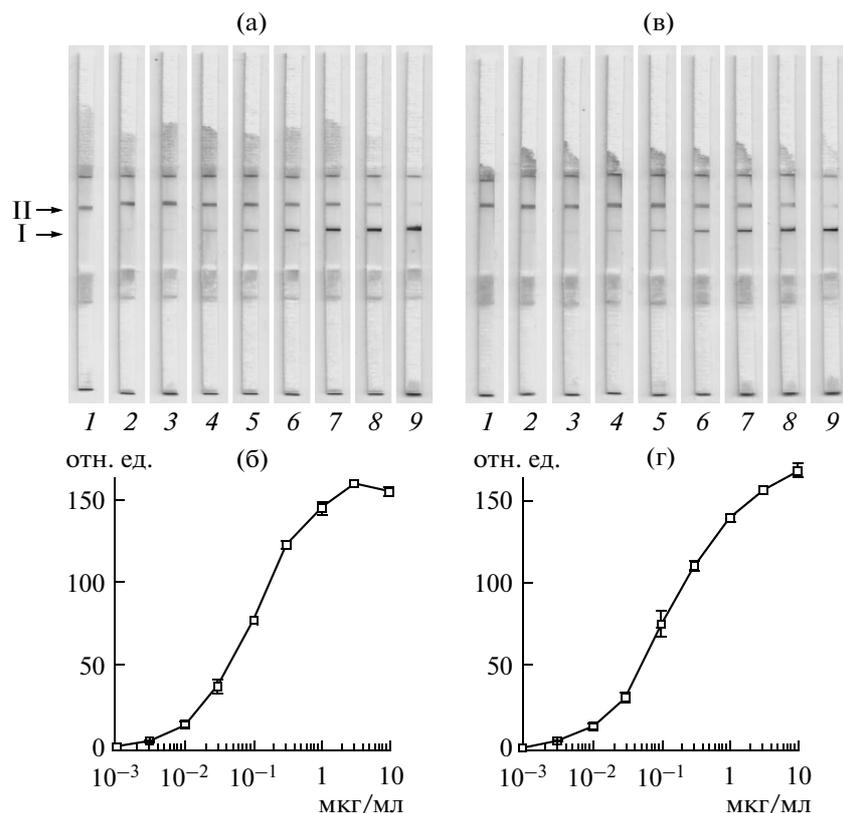


**Рис. 3.** Зависимость градуировочной кривой ИХА от концентрации ЛПС *B. abortus* при иммобилизации в аналитической зоне тест-полоски антител 7F10 (1) и БИМА (2).

ния ИФА, варьируя количество антител, иммобилизованных на твердой фазе, концентрацию биотинилированных антител в растворе и продолжительность стадий анализа. Как следует из полученных в оптимизированных условиях градуировочных кривых ИФА (рис. 1), предел детекции ЛПС составляет 50 нг/мл в случае, когда иммобилизованы антитела 7F10, а конъюгат БИМА–биотин находится в растворе (кривая 2, рис. 1) и 200 нг/мл, если иммобилизованы антитела 7F10, а конъюгат 7F10–биотин находится в растворе (кривая 1, рис. 1) либо иммобилизованы антитела БИМА, а конъюгат 7F10–биотин находится в растворе (кривая 3, рис. 1). При использовании только антител БИМА предел детекции ЛПС резко возрастает и составляет 10 мкг/мл (данные не представлены).

Однако поскольку в иммунохроматографической системе в неравновесных условиях взаимодействие компонентов определяется прежде всего кинетической константой скорости их взаимодействия, оптимальные комплекции тест-систем могут не совпадать для равновесных (ИФА) и кинетических (ИХА) форматов иммуноанализа. Поэтому представлялось целесообразным реализовать и сопоставить все возможные варианты ИХА.

**Получение и характеристика конъюгатов специфических антител с КЗ.** КЗ синтезировали по методу Френса [28]. Электронная микроскопия частиц показала высокую степень их однородности



**Рис. 4.** Иммунохроматографическое определение ЛПС *B. abortus* в буфере (а, б) и фетальной сыворотке КРС (в, г): а, в — внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I — аналитическая зона, II — контрольная зона); 1–9 — концентрации ЛПС 0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 и 10 мкг/мл соответственно; б, г — зависимость интенсивности окраски в аналитической зоне (отн. ед.) от концентрации ЛПС (мкг/мл).

по размерным характеристикам: среднее значение максимальной оси составляло  $37 \pm 8$  нм, минимальной оси —  $30 \pm 5$  нм [29]. Таким образом, частицы характеризовались средним диаметром 34 нм, что соответствует общепринятым рекомендациям по оптимальному размеру КЗ для иммунохроматографии — 30–40 нм [32].

Выбор соотношения антитела : КЗ проводили на основании флоккуляционной кривой, отражающей агрегацию продукта данной реакции при высокой ионной силе раствора. На основании полученных концентрационных зависимостей (рис. 2) для конъюгирования использовали антитела в количестве, на 10–15% превосходящем точку выхода  $D_{580}$  на плато, как рекомендовано в [27] — т.е. антитела 7F10 в концентрации 12 мкг/мл либо антитела БИМА в концентрации 8 мкг/мл. Мольное соотношение антитела : КЗ при синтезе составляло 380 : 1 для антител 7F10 и 255 : 1 для антител БИМА.

Избыток непрореагировавших антител удаляли на стадии осаждения конъюгата. Конъюгат антител 7F10 с КЗ при этом сохранял стабильность и иммунологическую активность, а конъюгат антител БИМА с КЗ необратимо агрегировал и в

связи с этим не использовался в последующих экспериментах. Вероятная причина отличий состоит в особенностях ориентации антител разных классов. Так, известно [33], что антитела IgG1 и IgG2 при сорбции на КЗ характеризуются разной ориентацией и степенью доступности.

**Разработка иммунохроматографической тест-системы.** Для достижения минимального порога детекции ЛПС и клеток возбудителя бруцеллеза была проведена оптимизация тест-системы, включавшая выбор типа, концентрации и режима нанесения реагентов в контрольной, аналитической и стартовой зонах тест-полоски.

Серия препаратов антител против IgG мыши, нанесенных в контрольную зону, была сопоставлена по связыванию конъюгата 7F10–КЗ в ходе иммунохроматографии. При насыщающих концентрациях интенсивность окраски контрольной зоны составляла для козьих антител 74 отн. ед. (GAMIss) и 89 отн. ед. (GAMI), для кроличьих антител — (RAMIss) 59 отн. ед. и для овечьих антител (SAMIss) — 82 отн. ед. Для дальнейшего использования в анализе были выбраны козы антитела GAMI фирмы “Arista Biologicals”, обеспечивающие максимальное связывание маркера. Концен-

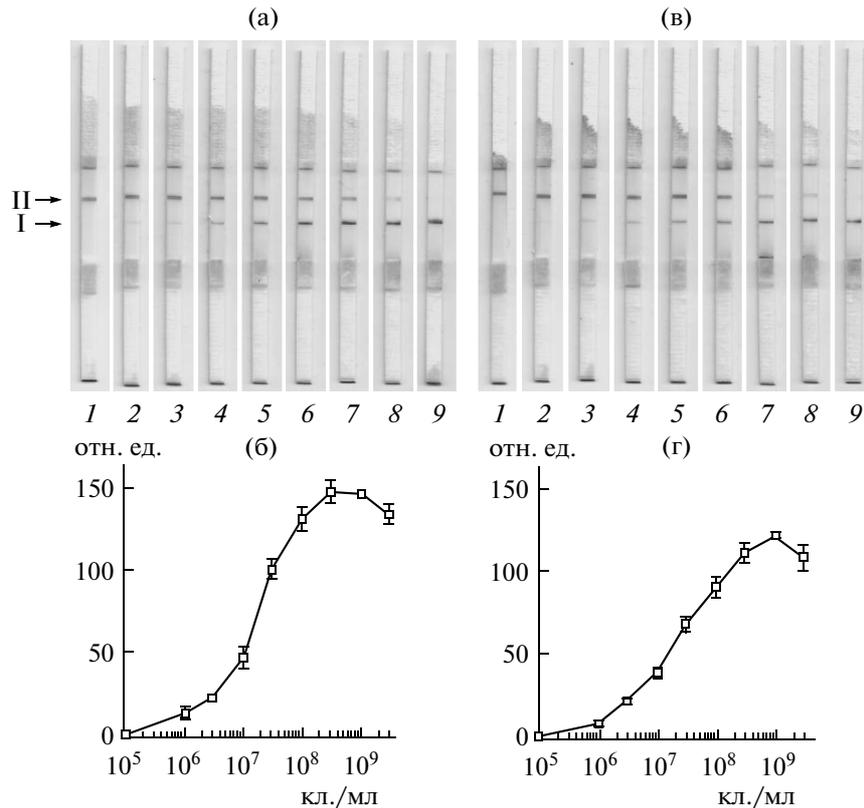


Рис. 5. Иммунохроматографическое определение клеток *B. abortus* в буфере (а, б) и фетальной сыворотке КРС (в, г): а, в — внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I — аналитическая зона, II — контрольная зона); 1–9 — концентрации клеток  $0$ ,  $10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $10^9$  и  $3 \times 10^9$  кл./мл соответственно; б, г — зависимость интенсивности окраски в аналитической зоне (отн. ед.) от концентрации клеток (кл./мл).

трация этих антител при иммобилизации составила  $0.25$  мг/мл, что соответствует выходу на плато концентрационной зависимости связывания коллоидного конъюгата.

При формировании аналитической зоны тест-полоски сравнивали два варианта, которые различались выбором иммобилизуемых на мембране антител. На рис. 3 представлена зависимость градуировочной кривой ИХА от концентрации ЛПС при иммобилизации в аналитической зоне тест-полоски антител 7F10 и БИМА. В обоих случаях интенсивность окрашивания аналитической зоны при концентрации ЛПС в пробе  $10$  мкг/мл составляла  $90 \pm 3$  отн. ед. Предел обнаружения ЛПС при данных условиях равняется  $50$  нг/мл при иммобилизации в аналитической зоне антител 7F10 (кривая 1) и  $10$  нг/мл при иммобилизации антител БИМА (кривая 2). Исходя из этого, для дальнейшего использования в анализе был выбран вариант с иммобилизованными в аналитической зоне антителами БИМА.

Скорость нанесения реагентов в контрольную и аналитическую зоны, равная  $2.0$  мкл на  $1$  см ширины рабочей мембраны, выбранная нами в предыдущих исследованиях [29, 34], обеспечива-

ла равномерность формирования зон и минимальный разброс по степени связывания.

Исходя из данных наших предшествующих работ [29, 34], конъюгат антитела–КЗ наносили из раствора, характеризующегося  $D_{520} = 2.0$ , что обеспечивало формирование интенсивно окрашенных зон в ходе анализа в сочетании с полной вымывания реагента из стартовой зоны и отсутствием неспецифического окрашивания рабочей мембраны.

**Характеристика разработанной иммунохроматографической тест-системы.** В соответствии с выбранными оптимальными условиями были изготовлены тест-полоски, использованные для определения ЛПС и клеток *B. abortus* в стандартных растворах и фетальной сыворотке КРС.

На рис. 4 представлены результаты анализа проб с разной концентрацией ЛПС. Предел определения ЛПС в ФБС и фетальной сыворотке одинаков и составляет  $10$  нг/мл, точность определения —  $5\%$ . На рис. 5 даны аналогичные результаты по определению клеток *B. abortus* 19. Предел детекции клеток в ФБС и фетальной сыворотке также одинаков —  $10^6$  кл./мл ( $5 \times 10^4$  кл./пробе), точ-

ность определения – 5%. Длительность анализа в обоих случаях составляет 10 мин.

В иммунохроматографической системе не наблюдалось перекрестных реакций с патогенными микроорганизмами: *B. suis*, *Yersinia enterocolitica* O:9 S и 287, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* Inaba, *Salmonella enteritidis* yena, *S. typhimurium* TA 100, *Escherichia coli* 565, *E. coli* 113-3, *Shigella sonne*, *S. flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii* при концентрациях вплоть до  $10^9$  кл./мл. Исключение составлял возбудитель иерсиниоза *Y. enterocolitica* O:9 R, который выявлялся в концентрациях, начиная с  $10^7$  кл./мл. Причина этой перекрестной реактивности состоит в сходстве O-специфического полисахарида, входящего в состава структуры ЛПС *B. abortus* 19 и *Y. enterocolitica* O:9 R [35, 36].

Компоненты тест-системы сохраняли иммунологическую активность в течение 20 нед. (срок наблюдения) хранения при 4 и 37°C, что свидетельствует об их эффективной стабилизации.

Скорость определения и методическая простота позволяют рассматривать разработанную тест-систему как эффективное средство для обследований крупного рогатого скота с целью диагностики бруцеллеза.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 12-08-01303), Федеральных целевых программ “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (государственный контракт П423 от 12 мая 2010 г.) и “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” (государственный контракт 11.519.11.2046 от 20 марта 2012 г.).

Авторы выражают признательность Сафенковой И.В. (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН) за проведение электронно-микроскопических исследований препарата коллоидного золота.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nicoletti P. // Contributions. Sec. Biol. Med. Sci. MASA. 2010. V. 31. № 1. P. 21–32.
2. Gul S.T., Khan A. // Pakistan Vet. J. 2007. V. 27. № 3. P. 145–151.
3. Искандаров М.И., Федоров А.И., Альбертян М.И., Найманов А.Х., Овдиенко Н.П. // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2006. № 4. С. 4–5.
4. Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Вилинская С.В., Головнева С.И., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 1(107). С. 20–23.
5. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е., Кулаков Ю.К., Хадарцев О.С., Горшенко В.В., Иванова А.А. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009. № 6. С. 23–28.
6. Цирельсон Л.Е., Грушина Т.А., Сыздыков М.С., Ременцова М.М., Коляда Ю.И. // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. 2004. Т. 10. № 2. С. 90–95.
7. Poester F.P., Nielsen K., Samartino L.E., Yu W.L. // Open Vet. Sci. J. 2010. V. 4. P. 46–60.
8. Godfroid J., Nielsen K.H., Saegerman C. // Croat. Med. J. 2010. V. 51. P. 296–305.
9. Queipo-Ortuno M.I., Colmenero J.D., Requera J.M., Garcia-Ordóñez M.A., Pachon M.E., Gonzalez M., Morata P. // Clin. Microbiol. Infect. 2005. V. 11. № 9. P. 713–718.
10. Reid L., Soares R., Vasconcellos S., Megid J., Salgado V., Richtzenstein L. // Res. Vet. Sci. 2009. V. 86. P. 22–27.
11. Kimura M., Imaoka K., Suzuki M., Kamiyama T., Yamada A. // J. Vet. Med. Sci. 2008. V. 70. P. 707–709.
12. Greiner M., Verloo D., de Massis F. // Prev. Vet. Med. 2009. V. 92. P. 373–381.
13. Minas A., Stournara A., Minas M., Papaioannou A., Krikelis V., Tselepidis S. // Vet. Microbiol. 2005. V. 111. P. 211–221.
14. Rubio M., Barrio B., Diaz R. // Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2001. V. 19. № 8. P. 406–407.
15. Lawman M.J., Thurmond M.C., Reis K.J., Gauntlett D.R., Boyle M.D.P. // Vet. Immunol. Immunopathol. 1984. V. 6. № 3–4. P. 291–305.
16. Saegerman C., De Waele L., Gilson D., Godfroid J., Thiange P., Michel P., Limbourg B., Vo T.K., Limet J., Letesson J.J., Berkvens D. // Vet. Microbiol. 2004. V. 100. № 1–2. P. 91–105.
17. Nielsen K.H., Kelly L., Gall D., Nicoletti P., Kelly W. // Vet. Immunol. Immunopathol. 1995. V. 46. № 3. P. 285–291.
18. Kumar M., Chand P. // Trop. Anim. Health. Prod. 2011. V. 43. № 8. P. 1493–1499.
19. Genc O., Buyuktanir O., Yurdusev N. // Trop. Anim. Health. Prod. 2012. V. 44. № 2. P. 213–215.
20. Gall D., Nielsen K. // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004. V. 23. № 3. P. 989–1002.
21. Wong R.C., Tse H.Y. Lateral Flow Immunoassay. N.Y.: Humana Press, 2009. 224 p.
22. Posthuma-Trumpie G., Korf J., van Amerongen A. // Anal. Bioanal. Chem. 2009. V. 393. № 2. P. 569–582.
23. Старовойтова Т.А., Зайко В.В., Стериополо Н.А., Мартынкина Л.П., Кутвицкий В.А., Туголуков А.Е., Волощук С.Г., Тогузов Р.Т., Венгеров Ю.Ю. // Биомед. журн. Medline.ru. 2010. Т. 11. С. 44–62.
24. Breslauer D.N., Maamari R.N., Switz N.A., Lam W.A., Fletcher D.A. // PLoS ONE. 2009. V. 4. № 7. P. e6320.
25. Герхард Ф., Мюррей Р.Ж.Е., Костилоу Р.Н. // Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1984. 472 с.
26. Булашев А.К., Несмеянов В.А., Дмитриев А.Ф., Муканов К.К., Байтубаев Т.Г., Ромахов В.А., Касьянов А.Н. А.с. СССР № 1604848. // Б. И., 1990. № 41.
27. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. Amsterdam: Acad. Press, Elsevier, 2008. 900 p.
28. Frens G. // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. № 105. P. 20–22.

29. *Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B.* // *Talanta*. 2010. V. 81. № 3. P. 843–848.
30. *Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М.* Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
31. *Дзантиев Б.Б., Жердев А.В.* // Биохимические методы анализа. М.: Наука, 2010. С. 303–332.
32. *Chandler J., Gurmin T., Robinson N.* // *IVD Technology*. 2000. V. 6. № 2. P. 37–49.
33. *Zhou J., Chen S., Jiang S.* // *Langmuir*. 2003. V. 19. № 8. P. 3472–3478.
34. *Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* // Прикл. биохимия и микробиология 2011. Т. 47. № 6. С. 685–693.
35. *Григорьева Г.И., Игнатов П.Е.* // Успехи соврем. биол. 1991. Т. 3. № 6. С. 890–904.
36. *Bundle D.R., Gidney M.A.J., Perry M.B.* // *Infect. Immun.* 1984. V. 46. № 2. P. 389–393.

## Development of Immunochromatographic Test System for the Rapid Detection of Lipopolysaccharide Antigen and Cells of Causative Agent of Bovine Brucellosis

N. A. Byzova<sup>a</sup>, A. V. Zherdev<sup>a</sup>, S. Z. Eskendirova<sup>b</sup>, K. K. Baltin<sup>b</sup>, G. B. Unysheva<sup>b</sup>, K. K. Mukanov<sup>b</sup>, E. M. Ramankulov<sup>b</sup>, and B. B. Dzantiev<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry Russian Academy of Sciences, Moscow 119071*

<sup>b</sup> *National Center for Biotechnology of the Republic of Kazakhstan, Astana, Kazakhstan*

*e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru*

Received April 16, 2012

**Abstract**—A rapid method for detection of the surface lipopolysaccharide antigen and the cells of the causative agent of bovine brucellosis was developed. The method represents a sandwich format immunochromatographic assay. The contact between the sample and the test strip with immobilized immunoreagents initiates the fluid movement along the membrane components of the test strip, immunochemical reactions, and the formation of colored bands. The novel method requires 10 minutes to determine the lipopolysaccharide antigen of the cell wall of the brucellosis causative agent at concentrations down to 10 ng/mL and the *Brucella abortus* cells at concentrations down to 10<sup>6</sup> cells/mL (5 × 10<sup>4</sup> cells in the sample). The specificity of the immunodetection was confirmed. The designed test system can be used for the rapid field diagnosis of brucellosis in cattle.