

DEVELOPMENT OF AN ENZYME IMMUNOASSAY DIAGNOSTIC TEST FOR DETECTION OF FIRE BLIGHT PATHOGEN *Erwinia amylovora*

Azhimahan M.A.¹, Varisev. U.A.², Drenova N.V.³, Khasanov V.T.¹, Dzhaymurzina A.A.⁴, Tuleeva A.K.¹, Umiralieva Zh.Z.⁴

¹JSC «S.Seifullin Kazakh Agro Technical University»

Pobedy, 62, Astana, 010000, Kazakhstan

²SSI All-Russian research institute of potato farming by A.G.Lorh

villageKorenevo, str. Lorch, 23, Moscow Region, 140052, Russian Federation

³SSI «All-Russian Plant Quarantine Centre»

Ramenskoye district, villageBykovo, str. Border, 32, Moscow Region, 140150, Russian Federation

⁴LLP «Kazakh Research Institute of plant protection and quarantine»

Karasai district, village Rakhat, str. Kazybekbi, 1, Almatyregion, 040924, Kazakhstan

miss_moli_92@mail.ru

ABSTRACT

We designed a test system for the immunoferrmental analysis of *Erwinia amylovora*, the causative agent of fire blight in fruit crops. We isolated bacteria from fruit samples cultivated in the Uigur district of Almaty, Kazakhstan. For the selection of causative agent to the studied bacterium on different nourishing environments, the best a Levanovaya environment appeared of environments further is an environment of KingaB In and potato agar. We isolated bacteria and identified their species, using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Immunization of laboratory animals' suspension of bacterial cages was carried out (anti-gene). For the receipt of specific antisera used the strain of CFBP 1430 (Bielefeld, France, isolated в1972, author SamsonR.) from collection of *E. amylovora* FGBU 'VNIKR'.

Antiserum with a specific caption 1: 10⁷ in ELISA was received. *Erwinia amylovora* specific for immunoglobulin from which they were emitted and conjugates of antibodies with high cleaning peroxidase of horseradish were prepared. The sandwich ELISA exhibited a sensitivity of 8 x 10⁴ cells/mL, which exceeds the sensitivity of the commercial analog. Test systems were compared based on their sensitivity and specificity to various strains of *E. amylovora*, isolated from the Russian Federation, Kyrgyzstan, Kazakhstan, Moldova, Poland, and France, as well as other species of the genus *Enterobacteriaceae* from FGBU 'VNIKR'. The strain CFBP 1430 was used as a control.

Keywords: burn fruit crops, *Erwinia amylovora*, antigen, antibody, immunisation, ELISA, test system.

УДК: 631.576:632.522 (045)

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР (*Erwinia amylovora*)

Әжімахан М.Ә.¹, Варицев Ю.А.², Дренова Н.В.³, Хасанов В.Т.¹, Джаймурзина А.А.⁴, Тулеева А.К.¹, Умиралиева Ж.З.⁴

¹АО «Казакский агротехнический университет им. С. Сейфуллина»

пр.Победы, 62, Астана, 010000, Казакстан

²«ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха»

Люберецкий район, п. Коренево, ул. Лорха, 23, Московская область, 140052, Российская Федерация

³ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»

Раменский район, п. Быково, ул. Пограничная, 32, Московская область, 140150,
Российская Федерация
4ТОО «Казахский НИИ защиты и карантина растений им.Ж. Жиёмбаева»
Карасайский район, п.Рахат, ул. Казыбекби, 1,Алматинская область, 040924, Казахстан
miss_moli_92@mail.ru

АБСТРАКТ

В статье представлены результаты получения иммунореагентов и конструирования тест-системы для иммуноферментного анализа на возбудитель бактериального ожога плодовых культур (*Erwinia amylovora*). В ходе исследований из отобранных растительных образцов плодовых культур, возделываемых на территории Уйгурского района Алматинской области, идентифицированы образцы. Для выделения возбудителя изучаемой бактерии на различных питательных средах наилучшей из сред оказалась левановая среда, далее – среда Кинга В и картофельный агар. Выделение изолятов бактерий и их идентификация была проведена с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР). Иммунизация лабораторных животных проведена суспензией бактериальных клеток (антигеном) *Erwinia amylovora*. Для получения специфических антисывороток использовали штамм CFBR 1430 (Bielefeld, France, изолирован в 1972 г., автор Samson R.) из коллекции *E. amylovora* ФГБУ «ВНИИКР».

Получена антисыворотка со специфическим титром $1:10^7$ в ИФА, из которой выделены специфичные к *Erwinia amylovora* иммуноглобулины и приготовлены конъюгаты антител с высокоочищенной пероксидазой хрена. В результате сравнительных испытаний установлено, что чувствительность анализа в «сэндвич-варианте» разработанной иммуноферментной тест-системы составляет 8×10^4 кл/мл, что в пять раз превышает чувствительность коммерческого аналога. Тест-системы сравнивали по критериям чувствительности и специфичности к различным штаммам *E. amylovora* из Российской Федерации, Кыргызстана, Казахстана, Молдовы, Польши и Франции, а также другим видам рода *Enterobacteriaceae* из коллекции ФГБУ «ВНИИКР».

Ключевые слова: ожог плодовых культур, *Erwinia amylovora*, антиген, антитело, иммунизация, иммуноферментный анализ, тест-система.

ВВЕДЕНИЕ

В казахстанских садах распространилась опасная болезнь – ожог плодовых культур, вызываемая бактерией *Erwinia amylovora* (Burrill) (Winslow et al.). Она поражает многие древесно-кустарниковые плодовые и декоративные породы, относящиеся к семейству Розоцветных. Среди наиболее хозяйственно значимых – груша, яблоня, айва, мушмула, боярышник, кизильник и др. Впервые подозрения на бактериальный ожог в Республике Казахстан были отмечены в 2008 году в Алматинской области. На плодовых деревьях наблюдались такие признаки как побурение и скручивание побегов, увядание цветков, язвы на коре ветвей и стволов, капли молочно-белого или янтарно-желтого экссудата. В течение некоторого времени заболевание принимали за схожий по симптомам бактериальный некроз, вызываемый *Pseudomonas syringae* [1].

Ограничить распространение ожога плодовых очень сложно. Это связано с высокой вероятностью длительного латентного периода, высокой встречаемостью растений-хозяев, а также большим числом возможных путей распространения инфекции, среди которых распространение посадочным материалом, насекомыми, птицами, ветром, орудиями труда и т.п. В результате, при наличии благоприятных климатических условий и восприимчивых растений, наблюдается быстрое увеличение зараженных площадей.

На сегодня площадь яблоневых садов в Казахстане составляет около 30 тысяч гектаров. По данным Министерства сельского хозяйства Казахстана [2,3], в 2014 г. мониторинговые обследования на выявление бактериального ожога были проведены на площади 5395 га, в 2015 г. – на площади 11345 га. По результатам мониторинга 2015 года ожог выявлен в Алматы и Алматинской области на площади 674,8 га (в том числе новые очаги на площади 336,8 га), в Жамбылской области – на площади 103,7 га (в том числе 31,1 га новых очагов), в Южно-Казахстанской области – на площади 5,3 га.

В последние годы в Казахстане происходит модернизация лабораторной диагностики бактериальных болезней растений, чему способствовало распространение в республике ожога плодовых культур [4]. На смену классическим бактериологическим методам (выделение чистой культуры, метод Уайта, метод Рью) приходят иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР), как более эффективные и высокочувствительные методы определения возбудителей бактериальных болезней.

Следует отметить, что если в Российской Федерации уже около 10 лет выпускаются и с успехом используются в странах Таможенного союза коммерческие наборы для диагностики возбудителя ожога плодовых методом ПЦР, то к промышленному производству иммуноферментных диагностических тестов к возбудителю этого заболевания, по существу, еще не приступали. Российские и казахстанские сельскохозяйственные предприятия, а также научно-исследовательские учреждения в связи с отсутствием на отечественных рынках тест-систем вынуждены приобретать коммерческие ИФА тесты иностранного

производства, что связано с большими материальными затратами и рисками потери качества при транспортировке. В этой связи получение отечественных высокочувствительных диагностических тестов для детекции опасных карантинных объектов является весьма актуальной проблемой для стран Единого Экономического Союза.

Цель настоящих исследований – разработка иммуноферментной диагностической тест-системы для детекции возбудителя бактериального ожога плодовых культур в Республике Казахстан.

Исследования проводились в лаборатории биотехнологии кафедры защиты и карантина растений АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина». ПЦР-диагностику и выделение возбудителя бактериального ожога проводили в отделе карантина Казахского НИИ защиты и карантина растений. Получение конъюгатов антител проводили в отделе биотехнологии и иммунодиагностики ФГБНУ «Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха». Испытание полученной иммуноферментной тест-системы проводили в научно-методическом отделе фитопатологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР») на коллекции штаммов *E. amylovora* других видах рода *Enterobacteriaceae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор растительных проб яблонидля тестирования на зараженность *E. amylovora* осуществляли во второй декаде июня 2015 года на участке 10 га КХ «Махмуд» Уйгурского района Алматинской области. Для анализа отбирали образцы растений, имеющих наиболее типичные признаки и отражающие общую картину болезни. При отборе образцов вырезали пораженные части растения с обязательным захватом здоровой ткани. Обращали внимание на такие признаки заболевания как усыхание и угнетение деревьев с изреженной кроной, поражение цветков, коры, наличие экссудата или другие признаки, отличающие их от здоровых растений. Каждый образец содержал не менее 5 частей растений с симптомами заболевания (пораженные соцветия, завязи, молодые побеги, срезы пораженной ткани ветвей и штамбов), которые помещали в сейф-пакет вместе с этикеткой с названием культуры, сорта, возраста, места, времени сбора и указанием типа поражения [4].

С помощью лупы отбирали плоды и кору деревьев с характерными признаками заболевания. Затем из пораженной ткани вырезали фрагмент, захватывая здоровый участок. Для стерилизации трижды промывали образцы водопроводной водой, после чего ополаскивали стерильной водой. При выделении из ветвей их трижды промывали в спирте, ополаскивая стерильной водой. Обработанные образцы растирали в ступке, высевали полученную массу на питательный агар и помещали в термостат, культивируя при температуре 28-30°C в течение 2-3 дней. Культивирование выделенного возбудителя проводили на 3-х питательных средах: картофельном и левановом агаре и на среде Кинга Б[5]. Чашки Петри ежедневно просматривали, исследуя цвет, форму и края колонии.

Отобранные растительные образцы в комплексе со скринингом колоний были исследованы на наличие *E. amylovora* методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) с использованием наборов ОАО «Агродиагностика» (Россия) согласно прилагаемой инструкции. Для выделения ДНК из растительных образцов использовали комплект реагентов «Проба-ГС», амплификацию проводили на приборе MasterCyclerGradient (Eppendorf, Германия) с использованием комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *E. amylovora* (формат «Real-time»).

Изоляты бактерий сохраняли в 15% глицерине при температуре -70°C. Для приготовления бактериальной суспензии колонии с твердой среды ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ).

Бактерии смывали с поверхности агаризованной среды фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и трижды центрифугировали на микроцентрифуге CM 50 Centrifuge (ELMI, Латвия) при 10000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а бактериальный осадок суспендировали в ФСБ и измеряли оптическую плотность на фотоэлектроколориметре КФК-3-01 (Россия) при длине волны 600 нм. Для иммунизации доводили плотность бактериальной суспензии до 10⁹ кл/мл стерильным ФСБ.

Специфические поликлональные антитела получали путем иммунизации 3-х кроликов (самцы) породы «Бабочка» в возрасте 3 месяцев [6] очищенным препаратом *E. amylovora*. До начала иммунизации у кроликов брали пробы крови для контроля иммунного статуса. В проводимых исследованиях была выбрана следующая схема иммунизации: 0-й, 7-й, 14-й, 21-й дни по 500 мкл антигена с концентрацией 10⁹ кл/мл с неполным адьювантом Фрейнда (Sigma, США) в соотношении 1:1 внутримышечно в 5 точек вдоль позвоночника. Отбор крови проводили на 35 день после начала иммунизации. После завершения иммунизации кровь кролика ставили на 2 часа в термостат при температуре 37°C, обводили и оставляли на ночь в холодильнике, отбирая отделившуюся от форменных элементов часть крови, которую центрифугировали при 3 тыс. об/мин в течение 10 мин, затем отбирали супернатант и консервировали мертиолятом натрия. Антисыворотку хранили при температуре +5°C.

Очистку поликлональных кроличьих антител, специфичных к *Erwinia amylovora*, проводили методом аффинной хроматографии с применением адсорбента – белок G-сефарозы согласно инструкции производителя – фирмы Биалекса (Россия). Полученный раствор антител разбавляли в соотношении 1:1 насыщенным раствором (NH₄)₂SO₄ и оставляли на сутки в холодильнике, затем центрифугировали при 12000 об/мин в течение 20 минут. Осадок растворяли в 2 мл ФСБ и диализовали против него же в течение суток с однократной сменой буфера. Диализованные антитела центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 минут,

консервировали глицерином до 50% (объем/объем) и хранили в морозильнике при 18-22°C. Активность полученных антител проверяли в непрямом варианте ИФА.

Конъюгаты антител с пероксидазой хрена получали с использованием периодатного метода [8].

Сравнительное испытание разработанной нами тест-системы с коммерческим набором ИФА к *Erwinia amylovora* фирмы Loewe (Германия) проводилось на чистых культурах бактерий. Тестирование проводилось во ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений». В ячейки 96-луночного полистирольного планшета (GREINERbio1, Австрия) вносили специфические антитела и инкубировали их в течение 14 часов при +4°C. После инкубации антител планшет трижды промывали ФСБ с 0,05% Твина-20 (ФСБ-Т). Плотность клеточной суспензии бактериальных штаммов (из коллекции ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений») измеряли с помощью прибора «NanoDroп 2000» (ThermoScientific, США), используя режим «cellculture» (600нм). Бактериальную суспензию вносили в лунки планшета в количестве 0,1 мл и инкубировали в течение 16 часов при температуре 5°C. Планшет трижды отмывали ФСБ-Т для удаления несвязавшегося антигена. Далее в лунки планшета вносили специфический конъюгат в разведении 1:10000 в объеме 0,1 мл и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Процедуру отмывки после инкубирования конъюгатов для удаления несвязанных продуктов реакции проводили 4 раза. Субстрат (орто-фенилендиамин–OPD, 0,4 мг/мл, перекись водорода 0,01%) вносили в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра (MultiscanAscent, ThermoScientific, США) при длине волны 450 нм [7]. Постановку реакций ИФА проводили с помощью диагностического набора фирмы Loewe (Германия), использующего щелочную фосфатазу в качестве ферментативной метки, согласно инструкции производителя. В качестве субстрата в наборе использовался р-нитрофенилфосфат. Оптическую плотность продукта ферментативной реакции считывали при длине волны 405 нм (A₄₀₅).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На первом этапе эксперимента проводили отбор растительного материала и получение чистой культуры возбудителя бактериального ожога (*E. amylovora*).

Идентифицированные образцы использовали для выделения возбудителя изучаемой бактерии на различных питательных средах. Наилучшей из сред оказалась левановая среда, далее – среда Кинга В и картофельный агар.

Идентификацию выделенных изолятов *E. amylovora* проводили методом RT-ПЦР (таблица 1).

Таблица 1. Результаты тестирования изолятов бактерий, выделенных из образцов яблони, на принадлежность к виду *E. amylovora* методом RT-ПЦР

Table 1. Results of testing isolates of bacteria isolated from apple samples to belong to the species *E. amylovora* by RT-PCR

Наименование изолята Isolate name	Растение-хозяин Host-plant	Признаки Features	Результаты RT-ПЦР Results of RT-PCR
AUA _v /1	Яблоня Apple tree	Листья усохшие, есть язвы на коре Leaves sphacelated, and there are scores on a bark	+
AUK _{гр}	Груша Pear tree	Листья усохшие темно- коричневого цвета Leaves sphacelated, dark brown	+
AUA _v	Яблоня Apple tree	Сплошное почернение листьев и стеблей Solid blackening of leaves and stems	+
AUA	Яблоня Apple tree	Листья темно-коричневого цвета, на коре образовались трещины Leaves dark brown there are cracks on a bark	+
AUK _{ябл}	Яблоня Apple tree	Все части растений усохшие и побуревшие All parts of a plant shriveled and	+

		browned	
AUA ₂	Яблоня Apple tree	Листья усохшие, есть язвы на коре Leaves shrunken , and have sores on the bark	+
ZhT	Яблоня Apple tree	Сплошное почернение листьев и стеблей Solid blackening of leaves and stems	-
ZhT ₁	Яблоня Сорт «Золотой Превосход» Appletree The variety «Golden Surpassing»	Листья усохшие темно-коричневого цвета Leaves sphacelated, and dark brown	+
ZhM	Яблоня Сорт «Айдаред» Apple tree The variety «Idared»	Листья усохшие, есть язвы на коре Leaves sphacelated, and there are scores on a bark	-
ZhZh	Яблоня Apple tree	Листья усохшие, есть язвы на коре Leaves sphacelated, and there are scores on a bark	+
CFBP 1430	<i>Crataegusoxycantha</i>	Нет сведений There are no data	+

Изоляты, идентифицированные как *E. amylovora*, были депонированы в коллекции ТОО Казахский НИИ защиты и карантина растений и использованы для дальнейших исследований.

Для получения специфических антисывороток использовали штамм CFBP 1430 (Bielefeld, France, изолирован в 1972 г., автор SamsonR.) из коллекции *E. amylovora* ФГБУ «ВНИИКР».

В процессе иммунизации кроликов этим изолятом были получены антисыворотки, которые титровались в непрямом варианте ИФА. В качестве антигена применялся бактериальный препарат, используемый при иммунизации животных.

Исследования показали, что применяемый антиген к возбудителю *E. amylovora* бактериального ожога обладал хорошими иммуногенными свойствами, специфический титр иммунных сывороток к изучаемому антигену в непрямом варианте ИФА достигал 1:10⁷. Неспецифический титр был низким и не превышал 1:8000.

На следующем этапе проведенных исследований был проведен подбор типа полистирольных плат и оптимальной концентрации специфических антител и пероксидазных конъюгатов (ConHRP). При этом использовали схему постановки реакции и неспецифические реагенты для ИФА наборов согласно инструкции ФГБНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха.

В эксперименте использовали коммерческие полистироловые планшеты для иммуноферментного анализа однократного применения (96 лунок с плоским дном). В качестве хромогенного компонента субстратной смеси во всех тест-системах применялся орто-фенилендиамин. Измерение оптической плотности (A₄₉₂) в ячейках планшетов проводили при 492 нм для OPD после добавления стоп-реагента.

Специфические части использовались в трех вариантах, названных нами тест-система-1, тест система-2 и тест-система-3, для которых использовались разные разведения антител и разведения конъюгатов.

В тест-системе-1 использовались высокосорбционные планшеты фирмы Greiner, Германия (Bio-one, Microlon HB).

В тест-системе-2 использовались среднесорбционные планшеты российского производства Санкт-Петербургского завода медпрепаратов (ОАО «Фирма Медполимер»).

В тест-системе-3 использовались среднесорбционные планшеты итальянского производства («ALTO») (таблица 2).

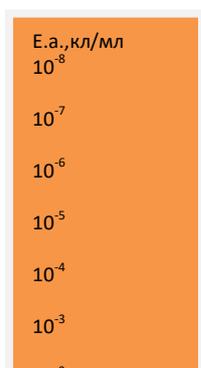
Таблица 2. Подбор оптимальных концентраций специфических антител опытной тест-системы на различных типах полистироловых планшет в «сэндвич-варианте» ИФА

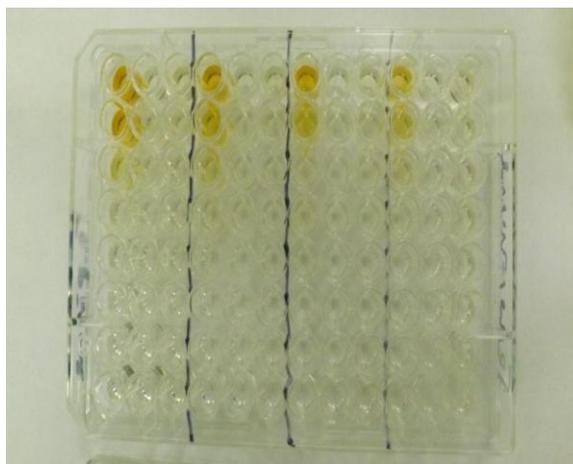
Table 2. Selection of the optimal concentration of antibodies specific experimental test systems on different types of polystyrene plate in a «sandwich» ELISA-Option

Повторность Replication	Экстинция A ₄₅₀ , o.e. A ₄₅₀ extinction, pu								
	Концентрация антител на плате МЕДПОЛИМЕР			Концентрация антител на плате GREINER bio1			Концентрация антител на плате ALTO		
	Concentration of antibodies on the MEDPOLIMER plate			Concentration of antibodies on the GREINER bio1 plate			Concentration of antibodies on the ALTO plate		
	0,5 мкг/мл mcg/ml	1,0 мкг/мл mcg/ml	1,5 мкг/мл mcg/ml	0,5 мкг/мл mcg/ml	1,0 мкг/мл mcg/ml	1,5 мкг/мл mcg/ml	0,5 мкг/мл mcg/ml	1,0 мкг/мл mcg/ml	1,5 мкг/мл mcg/ml
1	0,805	1,115	1,201	0,951	1,237	1,300	0,753	1,058	1,019
2	0,792	1,358	1,283	0,989	1,515	1,458	0,781	1,264	1,136
3	0,667	0,984	1,026	0,956	1,384	1,420	0,639	0,847	0,952
4	0,823	1,297	1,290	1,015	1,997	1,990	0,790	1,128	1,187

Согласно данным таблицы 2, применение концентрации специфических антител меньше 1 мкг/мл приводило к снижению оптической плотности во всех вариантах полистироловых плат, в то время как концентрация антител выше 1 мкг/мл не приводила к повышению оптической плотности.

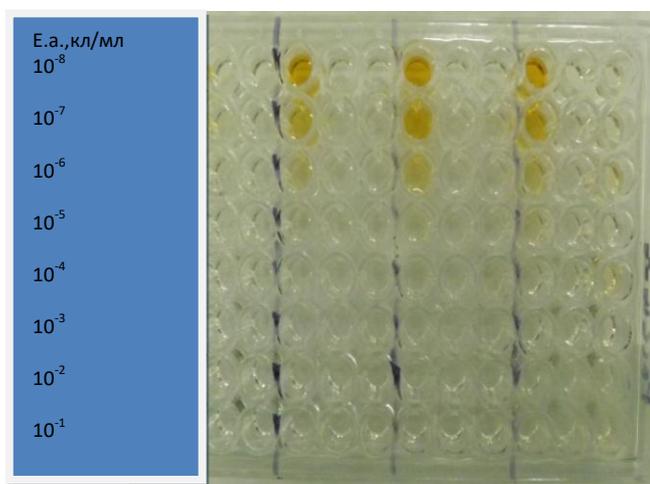
Проведенные исследования показали, что оптимальным (рабочим) разведением конъюгата с добавлением стоп-реагента для тест-системы-1 является разведение 1:10000, для тест-системы-2 – 1:8000 и тест-системы-3 – 1:1000 (рис. 1).





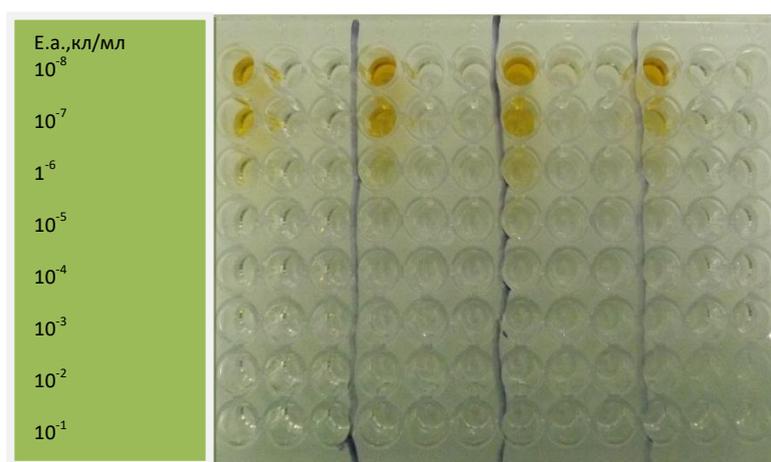
Conj. dilution 1:5000 1:10000 1:20000 1:40000

а



Conj. dilution 1:1000 1:2000 1:4000 1:8000

б



Conj. dilution 1:1000 1:2000 1:4000 1:8000

в

а – планшеты высокосорбционные «Bio-1, GREINER», Германия; субстрат ОФД, стоп-реагент 20% H₂SO₄ (тест-система-1)
 б – планшеты среднесорбционные «МЕДПОЛИМЕР», Россия; субстрат ОФД, стоп-реагент 20% H₂SO₄ (тест-система-2)

в – планшеты среднесорбционные «ALTO», Германия; ОФД, стоп-реагент 20% H₂SO₄ (тест-система-3)

Рис.1. Подбор оптимального разведения ConHRP к *Erwinia amylovora*

а – High-sorbing tablets of «Bio-one, GREINER», Germany; CRF substrate, stop-reagent 20% H₂SO₄ (test-system-1)

б – Medium-sorbing tablets of «MEDPOLIMER», Russia; CRF substrate, stop-reagent 20% H₂SO₄ (test-system-2)

в – Medium-sorbing tablets «ALTO», Germany; CRF stop reagent 20% H₂SO₄ (test system 3)

Fig. 1. Selection of the optimal breeding ConHRP to *Erwinia amylovora*

В проводимом эксперименте применение полистироловых плат фирмы GREINER в целом оказалось более эффективным.

После конструирования тест-системы проводили ее испытание в сравнении с коммерческим набором для определения *E. amylovora* «сэндвич-вариантом» ИФА фирмы LOEWE. Тест-системы сравнивали по критериям чувствительности и специфичности к различным штаммам *E. amylovora* из Российской Федерации, Кыргызстана, Казахстана, Молдовы, Польши и Франции, а также другим видам рода *Enterobacteriaceae* из коллекции ФГБУ «ВНИИКР». В качестве контроля использовали штамм CFBP 1430 (Франция) (табл. 3).

Таблица 3. Результаты сравнительного испытания тест-систем ИФА на коллекции изолятов *E. amylovora*

Table 3. Comparative test results of ELISA test systems on the collection of isolates of *E. amylovora*

№ образца № sample	Штаммы Strains	Экстинкция при A ₄₀₅ , о.е. Extinction at A ₄₀₅ , pu	
		опытная experimental	коммерческая commercial
1	CFBP1430 (контроль)	0,974	1,022
2	ACW 56 400	0,928	1,878
3	CFBP1430	0,918	1,272
4	FEa 10	0,971	1,020
5	Kaz E12	1,070	2,386
6	KyrE1	1,072	1,995
7	BE2	0,984	1,971
8	KBE1	0,975	1,656
9	KE18	0,917	1,418
10	MOE2	0,910	1,023
11	MSE1	0,924	1,364
12	SAE1	0,911	1,540
13	SE18	0,919	1,527
14	STE5	0,931	2,170
15	VRE16	0,889	1,414
16	<i>E. tasmaniensis</i>	0,321	-0,21
17	<i>E. piriflorinigrans</i>	0,312	-0,044
18	<i>E. billingiae</i>	0,324	0,006
19	<i>Rahnella aguatilis</i>	-0,029	0,0025
20	<i>Enterobacter amnigenus</i>	-0,065	-0,066
21	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SM18077	-0,004	-0,0605
22	<i>Dickeya dianthicola</i> (D-9)	-0,112	-0,096
23	<i>Dickeya sp. D. Fil</i>	-0,117	-0,095
24	Positive	0,880	2,197

25	Negative	-0,084	-0,032
----	----------	--------	--------

Исходя из полученных данных, опытная тест-система ИФА позволяла выявлять все испытанные изоляты *E. amylovora*, а также близкородственные виды *E. tasmaniensis*, *E. piriflorinigrans* и *E. billingiae*, и не реагировала с бактериями, не относящимися к роду *Erwinia*.

На заключительном этапе исследований сравнивали чувствительность разработанной тест-системы ИФА с импортным аналогом (табл.4).

Таблица 4. Сравнительное испытание тест-систем ИФА с использованием чистой культуры изолята *E. amylovora* CFBP 1430

Table 4. Comparison Test ELISA test systems using isolate a pure culture of *E. amylovora* SFBP 1430

Вариант тест-системы Test systems variant	Концентрация суспензии штамма CFBP 1430, КОЕ/мл Strain suspension concentration of CFBP 1430 cfu/ml				
	10^7	2×10^6	4×10^5	8×10^4	$1,6 \times 10^4$
Опытная Experienced	+	+	+	+	-
Коммерческая, фирмы LOEWE (Германия) Commercial, firms LOEWE (Germany)	+	+	+	-	-

В результате сравнительного лабораторного испытания сконструированной тест-системы установлено, что чувствительность ИФА с использованием разработанной тест-системы ИФА в «сэндвич-варианте» ИФА составила 8×10^4 КОЕ/мл, что в 5 раз превышало коммерческий аналог.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных научных исследований необходимо сделать следующие выводы:

1) идентифицированные образцы использовали для выделения возбудителя изучаемой бактерии на различных питательных средах. Наилучшей из сред оказалась левановая среда, далее – среда Кинга В и картофельный агар;

2) разработана тест-система для диагностики возбудителя ожога плодовых культур *E. amylovora* методом ИФА. Испытания на чистых культурах показали ее достаточно высокую специфичность, ложноположительные реакции были получены только с близкородственными непатогенными видами рода *Erwinia*, которые могут быть отбракованы при дальнейших исследованиях;

3) чувствительность тест-системы в «сэндвич-варианте» ИФА составляет 8×10^4 , что в 5 раз превышает широко используемый коммерческий аналог. Таким образом, разработанная тест-система ИФА может быть рекомендована в качестве предварительного теста для выявления и идентификации возбудителя ожога плодовых культур в растительных образцах при проведении обследований насаждений плодовых и декоративных растений.

Финансирование

Научные исследования проводились на инициативной основе при поддержке ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» и АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина».

ЛИТЕРАТУРА

1. Беда на наши яблоки [Электронный ресурс]. – 2013. URL: <http://www.caravan.kz/article/65880> (дата обращения: 25.02.2016).

2. Информация о проведении мероприятий по выявлению, локализации и ликвидации карантинных вредителей, болезней растений и сорняков за 2014 год/ Официальный сайт Министерства сельского хозяйства Казахстана. URL: http://mgov.kz/wp-content/uploads/2013/01/2015_g.xlsx (дата обращения: 25.02.2016).

3. Информация о проведении мероприятий по выявлению, локализации и ликвидации карантинных вредителей, болезней растений и сорняков по состоянию на 09 октября 2015 года/ Официальный сайт

Министерства сельского хозяйства Казахстана. URL: <http://mgov.kz/wp-content/uploads/2013/01/Informatsiya-o-provedenii-meropryatii-po-lokaliz.russ>(дата обращения: 25.02.2016).

4. Дренова Н.В., Исин М.М., Джаймурзина А.А. и др. Бактериальный ожог плодовых культур в Республике Казахстан. Карантин растений // Наука и практика. – 2013. – №3. – С. 39-44.

5. Межгосударственный стандарт. Методические рекомендации по выявлению бактериального ожога плодовых культур / ФГБУ «ВНИИКР», ЕАСС.8 – М., Москва 2010 г. – С. 6.

6. Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология. – Омск: Изд. ОмГАУ, 1996. – С.184-212.

7. Штерншиш М.В., Томилова Л.Г., Андреева И.В. Биотехнология в защите растений. – Новосибирск, 2001. – С.26-35.

8. Ворицев Ю.А., Белов Г.Л., Усков А.И. и др. Методические указания по диагностике возбудителей черной ножки (*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al.) и кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Kotth.) Skaptasson et Burk.) методами иммуноферментного анализа, иммунофлуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции. – М.: ВНИИ картофельного хозяйства, 2003. – 33 с.

REFERENCES

1. Beda na nashiyabloki [Elektronnyy resurs]. 2013. URL: <http://www.caravan.kz/article/65880>(дата обращения: 25.02.2016).

2. Informatsiya o provedeniimeropriyatipovyyavleniyu. lokalizatsiilikvidatsiikarantinnykhvrediteley. boleznyrasteniyisornyakovza 2014 god/ OfitsialnyysaytMinisterstvaselskogokhozyaystvaKazakhstan. URL: http://mgov.kz/wp-content/uploads/2013/01/2015_g.xlsx(дата обращения: 25.02.2016).

3. Informatsiya o provedeniimeropriyatipovyyavleniyu. lokalizatsiilikvidatsiikarantinnykhvrediteley. boleznyrasteniyisornyakovposostoyaniyuna 09 oktyabrya 2015 goda/ OfitsialnyysaytMinisterstvaselskogokhozyaystvaKazakhstan. URL: <http://mgov.kz/wp-content/uploads/2013/01/Informatsiya-o-provedenii-meropryatii-po-lokaliz.russ>(дата обращения: 25.02.2016).

4. Drenova N.V., Isin M.M., Dzhaymurzina A.A. et al. Ozhogplodovykhkultury v Respublike Kazakhstan. Karantinrasteniy. *Naukaipraktika*, 2013, no. 3, pp. 39-44.

5. Mezhgosudarstvennyy standart. Metodicheskiyerekomendatsiipovyyavleniyubakterialnogoozhogaplodovykhkultury. FGBU «VNIKPR», EASS, 8. Moskva, Moskva 2010 g., p. 6.

6. Kolychev N.M. Veterinarnayamikrobiologiyaiimmunologiya. Omsk, Izd. OmGAU, 1996, pp. 184-212.

7. Shternshis M.V., Tomilova L.G., Andreyeva I.V. Biotekhnologiya v zashchiterasteniy. Novosibirsk, 2001, pp. 26-35.

8. Varitsev Yu.A., Belov G.L., Uskov A.I. et al. Metodicheskiyeyukazaniyapoddiagnoztikevozbuditeleychernoynozhki (*Erwiniacarotovora* (Jones) Bergey et al.) ikoltsevoygnilikartofelya (*Clavibactermichiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. etKotth.) Skaptassonet Burk.) metodamiimmunofermentnogoanaliza, immunofluorescentnoymikroskopiiipolimeraznoytsenpnoyreaktsii. Moscow, VNI kartofelnogokhozyaystva, 2003, 33 p.

ЖЕМІС АҒАШТАРЫНЫҢ БАКТЕРИЯЛЫҚ КҮЙІК (*Erwinia amylovora*) АУРУЫНЫҢ ДЕТЕКЦИЯСЫНА ИММУНОФЕРМЕНТТІ ТЕСТ-ЖҮЙЕСІН ӨЗІРЛЕП ШЫҒАРУ

Әжімахан М.Ә.¹ Ворицев Ю.А.², Дренова Н.В.³ Хасанов В.Т.¹, Джаймурзина А.А.⁴, Тулеева А.К.¹, Умиралиева Ж.З.⁴

¹ «С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» АҚ, Жеңіс даңғылы, 62, Астана, 0110000, Қазақстан

² «ФМБФМ А.Г. Лорха атындағы Жалпыресейлік картоп шаруашлығы ФЗИ» Люберецкий ауданы, Коренево аулы, Лорха көшесі, 23, Мәскеу облысы, 140052, Ресей Федерациясы

³ ФМБМ «Жалпы ресейлік өсімдіктер карантині орталығы», Раменский ауданы, Быково ауылы, Пограничная көшесі, 32 үй, Мәскеу облысы, 140150, Ресей Федерациясы

⁴ ТОО «Ж. Жиёмбаев атындағы Қазақ өсімдік қорғау және карантин ФЗИ» Қарасай ауданы, Рахат ауылы, Қазыбек би көшесі, 1, Алматы облысы, 040924, Қазақстан

ТҮЙІН

Жеміс ағаштарының бактериялық күйік ауруының *E. amylovora* қоздырғышын анықтайтын диагностикалық ИФА әдісінің тест жүйесі әзірленді. Зерттеуге жеміс ағаштарының бактериялық күйік

ауруы анықталған Алматы облысы Уйгурский ауданынан жиналған үлгілер таңдап алынды. Идентификацияланған бұл үлгілерден бактерияның таза культураны бөлініп алынды. Ең оңтайлы қоректік орта ретінде Левановая қоректік ортасы, одан кейін Кинга В және картопты агар ортасы екендігі анықталды.

ИФА әдісі арқылы патогенді зерттеу нәтижесінде бактерияның таза культураны жоғарғы өзгешелігін көрсетті, теріс нәтижелердің оң көрсеткіш көрсетуі, олардың жақын туыстық патогендік емес түрлерімен ұқсас болуында, мұндай қателіктердің болмауы үшін әлі де жан-жақты зерттеулер жүргізіледі.

ИФА әдісінің "сэндвич-вариант" нұсқасындағы тест-жүйесінің сезімталдығы 8×10^4 жетті, бұл көрсеткіш коммерциялық баламадан 5 есе артық болды. Жасалған тест жүйені сезімталдық критериясына қарай түрлі Қазақстаннан, Ресей Федерациясынан, Қырғызстаннан, Молдовадан, Польшадан, Франциядан штамдармен, одан өзге *Enterobacteriaceae* туысына жататын ФГБУ «ВНИИКР» коллекцияларымен салыстырылды.

Сонымен ИФА нұсқасында әзірлеп шығарылған тест-жүйесі жеміс-ағаштарының бактериялық күйік ауруын алдын ала анықтау мен оларды бір жүйеге келтіруде қолдануға болады. Бұл зерттеу жұмысын жеміс баулары мен сәндік екпе өсімдіктерді *E. amylovora* қоздырғышына сынауда қолдануға ұсыныс жасалады.

Негізгі сөздер: жеміс ағаштарының бактериялық күйігі, *Erwinia amylovora*, антиген, антидене, иммундеу, иммуноферментті анализ, тест-жүйе.