

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ АНТИГЕНОВ В СЕРОДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*А.К. Булашев, О.С.Акибеков,
Ж.А. Сураншиев, А.С.Сыздыкова,
Б.Қ. Іңірбай*

АО «Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина»

Аннотация

Традиционные серологические реакций и коммерческие ИФА-наборы, используемые в диагностике бруцеллеза, определяют антигена с помощью антигена, изготовленного из бруцелл гладкой формы, основным компонентом которого являются липополисахариды. По этой причине эти тесты могут давать ложноположительные результаты из-за перекрестной реакций с другими грамотрицательными бактериями. Целью работы явилось сравнительное изучение иммуногенности рекомбинантных белков и экстрагируемого белкового антигена бруцелл на лабораторных животных, а также определение их антигенности на образцах сывороток крови коров, реагирующих на бруцеллез в РА, РСК и/или РБП. Использованные внешне-мембранные и/или периплазматические рекомбинантные белки обладали иммуногенностью, а именно способностью вызывать иммунный ответ в виде антителиобразования. Установлено, что в непрямом ИФА антигенные свойства белков внешней мембраны бруцелл лучше проявляются при скрининге коров из свежего очага бруцеллеза, тогда как периплазматические белки превосходят их по антигенности при исследований животных, содержащихся в стационарном очаге инфекции.

Ключевые слова: бруцеллез, *Brucella spp.*, рекомбинантные белки, антигенность, иммуногенность, серология, ИФА, крупный рогатый скот, диагностика.

Введение.

Бруцеллез - одна из наиболее распространенных зоонозных инфекций, которая приводит к инвалидности людей и причиняет большой экономический ущерб

животноводству всего мира [1]. На земле ежегодно регистрируется более полумиллиона новых случаев бруцеллеза среди людей, хотя эта цифра считается весьма заниженной. Учитывая высокую

заболеваемость людей и животных бруцеллезом в развивающихся странах, экономические последствия и трудность искоренения инфекции, Всемирная организация здравоохранения рассматривает бруцеллез как один из семи забытых зоонозов, способствующие сохранению бедности [2].

Возбудитель бруцеллеза – *Brucella* spp. является внутриклеточной, грамотрицательной бактерией. Прижизненная диагностика бруцеллеза животных, главным образом, основана на использовании серологических реакций, таких как реакция агглютинации (РА), роз-бенгал проба (РБП) и реакция связывания комплемента (РСК). В организме инфицированных или вакцинированных животных липополисахариды (ЛПС) бруцелл вызывают образования длительно циркулирующих антител [3]. В упомянутых выше традиционных серологических реакциях антитела определяются с помощью единого бруцеллезного антигена, изготавливаемого из типичных клеток бруцелл, находящихся в гладкой (S) форме. По этой причине весьма трудно дифференцировать вакцинированных от больных бруцеллезом животных, используя РА, РБП и РСК, а также коммерческие ИФА-наборы на основе ЛПС антигена [4]. Кроме того, серологические тесты, основанные на выявлении анти-ЛПС антител могут давать

ложноположительные результаты из-за перекрестной реактивности с другими грамотрицательными бактериями, такими как *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* spp. и *Escherichia coli* [3,5]. В этой связи, белки внешней мембраны (БВМ) *Brucella* находятся в центре внимания исследователей, занимающихся разработкой вакцин против бруцеллеза и диагностических средств [6, 7].

Клеточная стенка бруцелл состоит из пептидогликана, прочно связанного с внешним слоем, состоящим по меньшей мере из 75 белков, в том числе БВМ [8]. В состав этих белков входят БВМ группы 2 (порины с мол.м. 34-40 кДа) и группы 3 (25-30 кДа) [9], липопротеин, ковалентно связанный с пептидогликаном [10], и минорные БВМ группы 1 (88-94 кДа). В настоящее время известны работы, посвященные получению и исследованию иммуногенных и антигенных свойств рекомбинантных БВМ (рБВМ) бруцелл [11-13]. Однако, иммуногенность и антигенность рекомбинантных белков бруцелл все еще остаются малоисследованными, а полученные результаты – неоднозначными и дискуссионными.

Целью работы явилось сравнительное изучение иммуногенности и антигенности рБВМс молекулярной массой 25кДа (рБВМ25), 31 кДа (рБВМ31) и периплазматических рекомбинантных белков бруцеллрVP26 и рСОД.

Материалы и методы исследований

Лабораторные животные. Белые беспородные мыши в количестве 15 гол. содержались в стандартных условиях в соответствии с требованиями «Принципов надлежащей лабораторной практики (GLP)». Брикетированные комбикорма и вода лабораторным животным давались *adlibitum*. В помещениях для содержания мышей поддерживался 12-час цикл освещения. Температура и влажность воздуха контролировались ежедневно. Все мероприятия с участием животных выполнялись с соблюдением высоких стандартов биобезопасности и обеспечения благополучия животных. На проведение экспериментов с белыми мышами было получено разрешение этической комиссии АО «Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина».

Инактивированная бактериальная масса Brucella abortus 19 была любезно предоставлена НПО «Антиген» (Алматы).

Получение экстрагируемого белкового антигена (ЭБА) из клеток *B. abortus* 19 проводили по методу L.Tabatabai и D.Deyoe (1984) [14], основанный на элюировании БВМ 0,1М раствором цитрата натрия, содержащий 1М хлорида натрия и 0,1% тритона X-100.

Рекомбинантные белки бруцелл. В работе были использованы рекомбинантные белки внешней мембраны бруцелл, полученные в наших предыдущих исследованиях: рБВМ25 *B. abortus*

и рБВМ31 *B. Melitensis* [15]. Синтез нуклеотидных последовательностей указанных белков был выполнен компанией In vitro gen (Life Technologies, США). Кроме того, использовались и периплазматические белки *Brucella* spp.: рВР26 (рБВМ28) и рСОД, любезно предоставленные ведущим научным сотрудником Национального центра по биотехнологии Республики Казахстан, к.в.н., доцентом С.З.Ескендировой.

Культивирование штаммов-продуцентов и очистка рекомбинантных белков. Культуры *E. coli*- штаммов-продуцентов рекомбинантных белков выращивали в жидкой и твердой среде Лурия-Бертани, содержащей 1% бактотриптона, 0,5% дрожжевого экстракта и 1% NaCl (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл (Синтез, Россия). Рекомбинантный белок очищали с помощью металл-аффинной хроматографии с использованием коммерческих колонок HisTrapColumns (GE health care Life Sciences, Англия) в соответствии с наставлениями производителя.

Иммунизация белых мышей белковыми препаратами бруцелл. Для этой цели были использованы 5 групп беспородных мышей, по 3 головы в каждой группе. Животные первой группы иммунизировались рБВМ25, второй группы – рБВМ31, третьей группы – рВР26, четвертой группы - рСОД, пятой группы – ЭБА *B. abortus*. Количество белка на одну инъекцию составляло 25

мкг на голову. Иммунизацию мышей проводили по следующей схеме: в 1-ый день иммунизации антиген, эмульгированный в неполном адьюванте Фрейнда, инъецировали подкожно в количестве 100 мкл. Последующие инъекции антигена в ЗФР объемом 200 мкл осуществляют внутри брюшинно на 8-ой, 15-ый, 22-ой дни иммунизации. Тотальное обескровливание мышей проводили на 29-ый день опыта. Перед каждой иммунизацией и тотальным обескровливанием осуществляли забор крови из хвостовой вены.

Определение иммуногенности белковых антигенов бруцелл. Лунки полистиролового планшета (*Thermo Fisher Scientific*, США) раздельно сенсibilizировали белковыми препаратами бруцелл (4°C в течение 18 час.), использованными для иммунизации, в концентрации 5,0 мкг/мл в бикарбонатном буфере (БКБ) с рН 9,6. Затем, содержимое лунок удаляли и планшет отмывали несколько раз, заполняя лунки до верхнего края забуференным физиологическим раствором с добавлением Твина-20 (ЗФР-Тв). Далее, в восьми лунках готовили разведения образцов гомологичной антисыворотки, а также контрольной негативной сыворотки, взятой перед первой инъекции иммуногена, в ЗФР-Тв (1:100 – 1:12 800), и планшет выдерживали 1 час при 37°C. После отмывки планшет в лунки вносили рабочее разведение антимишиного конъюгата (*Sigma-Aldrich*, США) в ЗФР-Тв. Через 1 час после инкубации планшета в термостате

(37°C) повторяли процедуру отмывки для удаления несвязанного конъюгата, и в лунки вносили раствор субстрата – ортофенилендиамина (*Sigma-Aldrich*, США). Планшет оставляли в темном месте при комнатной температуре. Спустя 3-5 мин в лунки добавляли равное количество 2М серной кислоты. Поглощение измеряли при длине волны 492 нм с использованием планшетного ридера (*Bio-Rad 680*, США). За титр антител было взято разведение антисыворотки, оптическая плотность (ОП) которого в два и более раз превышала ОП контрольной негативной сыворотки в разведении 1:100.

Сыворотки крови. В работе были использованы образцы сывороток крови 43 коров из стационарного очага и 77 коров из свежего очага бруцеллеза, предоставленные РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» Комитета ветеринарного контроля и надзора МСХ РК и ветеринарной лабораторией Житикаринского района, Костанайской области, соответственно. Животные обеих групп положительно реагировали на бруцеллез по результатам традиционных серологических реакций (РА, РБП и/или РСК).

Антигенность белковых препаратов бруцелл определяли в н-ИФА по общепринятой методике [16]. Вкратце, лунки полистиролового планшета (*Thermo Fisher Scientific*, США) сенсibilizировали раздельно следующими антигенами бруцелл:

pBVM25, pBVM31, pBP26, pСОД и ЭБА *B. abortus*. После сенсibilизации и отмывки лунок активные центры твердой фазы нейтрализовали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. Далее, в двух лунках готовили разведения исследуемых образцов сывороток крови 1:100 и 1:200 в ЗФР-Тв, инкубировали в течение 1 часа и после отмывки планшет в лунки вносили анти-бычий IgG антитела, меченые пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich США). Результаты реакций проявляли с помощью субстрата фермента.

Реакцию считали положительной, если показатель

ОП исследуемой сыворотки в 2 и более раз превышал среднее значение ОП негативного контроля (cutoff) в разведении 1:100. В качестве негативного контроля были использованы сыворотки крови 19 телок благополучного по бруцеллезу хозяйства (ПК «Родина», Целиноградский район, Акмолинская область).

Статистическая обработка результатов серологических исследований проводилась по методике, описанной Т.С. Сайдулдиным (1981) [17].

Результаты исследований

Результаты изучения иммуногенности рекомбинантных белков и ЭБА *B. abortus* для организма белых беспородных

мышей приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Иммуногенность белковых антигенов бруцелл для белых мышей

Дни иммунизации	Пор.№ иммунизации	Номера мышей	Титры антител белых мышей в ИФА против				
			pBVM25	pBVM31	pСОД	pBP26	ЭБА <i>B. abortus</i>
1	Первая	(n=15)	Все мыши перед первой иммунизацией были серонегативными по отношению к использованным белковым антигенам бруцелл				
8	Вторая	1	1:100	1:100	PO	PO	1:200
		2	PO	PO	PO	PO	1:200
		3	1:100	PO	PO	PO	1:200
15	Третья	1	1:400	1:400	PO	1:6400	1:800
		2	1:400	1:800	PO	1:12800	1:800
		3	1:200	1:200	PO	1:12800	1:400
22	Четвертая	1	1:3200	1:6400	1:800	1:12800	1:6400
		2	1:6400	1:3200	1:400	1:12800	1:6400
		3	1:6400	1:6400	1:1600	1:12800	1:12800
29 день: тотальное обескровливание мышей		1	1:3200	1:3200	1:6400	1:6400	1:6400
		2	1:6400	1:1600	1:3200	1:12800	1:6400
		3	1:3200	1:3200	1:6400	1:6400	1:12800
Средний титр антител			1:490	1:490	1:260	1:1210	1:860

	(+40,4; -28,8)	(+40,4; -28,8)	(+40,4; -28,8)	(+49,5; -33,0)	(+44,4; -30,7)
Примечание: 1 – РО – реакция отрицательная					

Данные таблицы 1 свидетельствуют о различной иммуногенности использованных белковых препаратов. Например, при исследовании образцов крови мышей перед второй иммунизацией специфические антитела отсутствовали у животных, иммунизированных рБВМ31, рСОД и рВР26. К этому сроку иммунный ответ в виде антителообразования начал развиваться у мышей, иммунизированных рБВМ25 и рБВМ31 (1:100) и ЭБА *B. abortus* (1:200). Антитела у мышей к рСОД не выявлялись и перед третьей иммунизацией, тогда как титры антител у их аналогов, привитых рБВМ25 и рБВМ31, находились в пределах от 1:200 до 1:800. Обращает на себя внимание существенный подъем титра антител к этому сроку у животных, стимулированных рВР26 – 1:6 400 -

1:12 800. Дальнейшие инъекции мышам рекомбинантного белка рВР26 (третья и четвертая) не повлекло за собой повышение концентрации антител в сыворотке крови. После третьей иммунизации антителообразование к рБВМ25 и рБВМ31 (1:3200-1:6 400), а также ЭБА *B. abortus* (1:6 400-1:12 800) достигло своего апогея (22-ый день иммунизации). Однако, анти-рСОД антитела достигли этого уровня только на 29-ый день иммунизации, т.е. после четвертой инъекции препарата.

Антигенность белковых препаратов изучалась в н-ИФА на образцах сывороток крови коров из стационарного (43 гол.) и свежего очагов (77 гол.) бруцеллеза с положительными результатами на бруцеллез по показаниям традиционных серологических реакций (таблица 2).

Таблица 2 – Антигенность белковых препаратов по отношению к сывороткам крови серопозитивных коров неблагополучных по бруцеллезу пунктов

Кратность превышения ОПио над ОПКо (cutoff)	Белковые антигены бруцелл, использованные в н-ИФА									
	рБВМ25		рБВМ31		рВР26		рСОД		ЭБА <i>B. abortus</i>	
	Количество коров, положительно реагирующих на бруцеллез в н-ИФА									
	СТО	СВО	СТО	СВО	СТО	СВО	СТО	СВО	СТО	СВО
от 2,0 до 3,0	18	31	23	17	14	17	7	8	2	5
от 3,1 до 4,0	1	7	0	30	4	5	2	2	4	3
от 4,01 и выше	0	1	0	12	3	1	25	1	31	65
Всего, гол.	19	39	23	59	21	23	34	11	37	73

Примечания: 1 – ОПио – оптическая плотность исследуемого образца; 2 – ОПКо - среднее значение негативного контроля (cutoff); СТО – стационарный очаг бруцеллеза; СВО – свежий очаг бруцеллеза.

Из таблицы 2 видно, что максимальную антигенность к образцам сывороток крови серопозитивных коров из стационарного и свежего очагов бруцеллеза показал ЭБА *V. abortus*, обнаруживая антитела у 37 (86,0%) гол. и 73 (94,8%) гол., соответственно. Среди рекомбинантных белков рСОД показал наибольшую антигенность при исследовании сывороток крови коров из стационарного очага бруцеллеза, детектируя антитела у 34 гол. (79,1%). Три других рекомбинантных белка: рБВМ25, рВР26 и рБВМ31 выявляли наличие противобруцеллезных антител соответственно у 19 (44,2%), 21 (48,8%) и 23 (53,5%) коров, содержащихся в стационарном очаге инфекции. В группе коров из свежего очага

бруцеллеза рБВМ25 и рБВМ31 распознавались антителами 39 (50,6%) и 59 (76,6%) голов, соответственно. Следует отметить, что в данной группе животных периплазматические белки рВР26 и рСОД показали меньшую антигенность в сравнении с внешне-мембранными: 23 (29,9%) и 11 (14,3%) гол., соответственно.

В группе коров из свежего очага инфекции не было отмечено значимой корреляционной связи между результатами н-ИФА на основе различных белковых антигенов. Существенная зависимость между отдельными вариантами иммуноанализа была установлена по результатам серологических исследований коров, содержащихся в стационарном очаге бруцеллеза (табл. 3).

Таблица 3 – Коэффициенты корреляции результатов н-ИФА при использовании различных белковых антигенов бруцелл

Белки бруцелл, использованные в н-ИФА	рБВМ25	рБВМ31	рВР26	рСОД	ЭБА <i>V. abortus</i>
рБВМ25	1	0,72	0,52	-0,1	-0,12
рБВМ31	0,72	1	0,56	-0,21	-0,28
рВР26	0,52	0,56	1	-0,12	-0,13
рСОД	-0,1	-0,21	-0,12	1	0,57
ЭБА <i>V. abortus</i>	-0,12	-0,28	-0,13	0,57	1

Из таблицы 3 следует, что высокая корреляционная связь наблюдалась между результатами н-ИФА/рБВМ25 – н-ИФА/рБВМ31 ($r=0,72$). Заметная корреляционная связь отмечалась между н-ИФА/рБВМ25 – н-ИФА/рВР26 ($r=0,52$), н-ИФА/рБВМ31 – н-ИФА/рВР26 ($r=0,56$), н-ИФА/ЭБА *V. abortus* – н-ИФА /рСОД ($r=0,57$).

Обсуждение полученных данных и заключение

Сравнительные исследования иммуногенности рБВМ25, рБВМ31, ВР26 и рСОД показали, что использованные рекомбинантные

белки вызывают иммунный ответ в виде антителообразования. При этом, максимальные титры антител против рБВМ25, рБВМ31 были

отмечены на 22-ой день иммунизации, т.е. после третьей инъекции иммуногенов. Интенсивность антителообразования была слабее выражено у мышей, иммунизированных рСОД. У животных этой группы наибольшие титры специфических антител были достигнуты лишь к концу опыта (на 29-ый день) после четвертой инъекции препарата. Это явление может быть обусловлено меньшей доступностью этого периплазматического белка для иммунной системы, чем у белков внешней мембраны. Иммунный ответ в виде антителообразования на рСОД, по-всей вероятности, развивается позже, когда возбудитель болезни начинает усиленно вырабатывать данный фермент с целью детоксикации супероксидных радикалов, вырабатываемых организмом хозяина. Во-вторых, идентичность СОД у млекопитающих и бруцелл [18], может оказывать ингибирующее действие на гуморальный иммунный ответ мышей против рСОД.

Среди испытанных белковых препаратов наибольшей иммуногенностью, а именно способностью стимулировать антителообразование, обладал рВР26. Так, уже на 15-ый день опыта, т.е. после двукратной иммунизации с интервалом в 7 дней, была достигнута максимальная продукция иммунной системой мышей анти-ВР26 антител. Данный белок по своей иммуногенности не уступал

ЭБА бруцелл в состав которого входят не только комплекс различных белков, но и полисахаридные молекулы клеточной стенки патогена. Наши данные согласуются с результатами других исследователей, которыми сделаны заключения о иммунологически доминантности ВР26 и возможности его использования в серодиагностике бруцеллеза КРС [19].

Результаты традиционных серологических реакций не всегда подтверждались показаниями н-ИФА на основе белковых препаратов бруцелл. Так, например, среди коров двух неблагополучных пунктов, реагирующих на бруцеллез в РА, РСК и/или РБП, от 5,2% до 14% показали отрицательные результаты в н-ИФА/ЭБА *V. abortus*. Этот факт, на наш взгляд, свидетельствует о низкой специфичности единого бруцеллезного антигена из S-форм бруцелл, используемого в традиционных серологических реакциях. Использование в н-ИФА рекомбинантных белков привело к дальнейшему снижению чувствительности анализа. Причем, антигенность белков зависела от эпизоотической ситуации хозяйств. Например, в н-ИФА антитела к рСОД обнаруживалась у 79,1% серопозитивного (по РА, РСК и/или РБП) КРС из стационарного очага по бруцеллезу, тогда как антитела к этому белку выявлялись лишь у 14,3% животных, находящихся в очаге свежей инфекции ирБВМ25, рБВМ31 и рВР26 показали антигенность к сывороткам крови

половины серопозитивного поголовья (44,2%-53,5%) стационарного очага болезни.

Коровы из очага свежей инфекции, положительно реагирующие на бруцеллез в традиционных серологических тестах, лучше выявлялись в н-ИФА/рБВМ25 (50,6%) и н-ИФА/рБВМ31 (76,6%), чем при использовании в иммуноанализе периплазматических белков рВР26 (29,9%) и рСОД (14,3%). Сравнительно низкую антигенность рСОД к сывороткам крови коров из свежего очага бруцеллеза, как и низкую иммуногенность этого препарата для организма мышей, можно объяснить глубинным расположением супероксиддисмутазы в клетке бруцелл. По этой причине образование антител против антиоксидантного фермента патогена запаздывает по сравнению с иммунным ответом хозяина на внешне-мембранные белки. Что касается ВР26, то имеются различные предположения о его местоположении. Одни исследователи относят его к периплазматическим белкам, а другие - внутриклеточным растворимым белкам [20]. В обоих случаях, ВР26 также является менее доступным компонентом для иммунной системы, чем БВМ25 и БВМ31. В этой связи, антителообразование против ВР26 также будет запаздывать по сравнению с иммунным ответом на белки, расположенные на внешней мембране.

ЭБА *B. abortus*, хотя и состоит из белков клеточной

стенки, содержит примесей ЛПС. Поэтому, меньшая чувствительность н-ИФА/рБВМ по сравнению с н-ИФА/ЭБА *B. abortus*, на наш взгляд, обусловлена более высокой специфичностью первого варианта иммуноанализа. Как показали наши результаты, использование одиночных рекомбинантных белков бруцелл снижает чувствительность н-ИФА-теста. Так, в наших исследованиях среди рБВМ не было отдельно взятого белка, который показал бы суммарный положительный результат всех использованных белков.

Еще в 1996 году N.Vizcaino et al. сделан вывод о том, что БВМ с мол.м. 25 кДа является консервативным для рода *Brucella* в отличие от белка с мол.м. 31, который отсутствует у *B. abortus* [21]. Однако, J.P.Connolly et al. (2006) показали, что основные белковые компоненты *B. abortus*, идентифицированные с использованием двумерного электрофореза с матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации-масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии, включают не только БВМ с мол.м. 25 кДа, но и белок с мол.м. 31 кДа [22]. Далее, Kim et al. (2012) описали у *B. abortus* мембранный белок с мол.м. 31 кДа (БВМ31b), который обладал некоторым сходством с аналогичным белком других видов *Brucella* [23]. Нуклеотидная последовательность БВМ31 *B. ovis* была сходной с таковой у БВМ31b на 77% и обладал выраженной

антигенностью, показывая высокие значения ОП при серологических исследованиях КРС на бруцеллез методом н-ИФА [24]. Наши данные также подтверждают присутствие во внешней мембране *B. abortus* сходного белка с БВМ31 *B. melitensis* и его высокую антигенность. Так, например, данный белок превосходил по своей антигенности рБВМ25 при выявлении серопозитивных коров, находящихся как в стационарном очаге (53,5% против 44,2%), так и в свежем очаге бруцеллеза (76,6% против 50,6%).

Достигнутые результаты позволяют заключить, что внешне-мембранные белки (рБВМ25 и рБВМ31) являются более информативными при выявлении антител у КРС из свежего очага бруцеллеза, тогда как периплазматические белки (рВР26 и рСОД) значительно превосходят

их по антигенности при исследовании сывороток крови животных, содержащихся в стационарном очаге инфекции. Мы полагаем, что белки внешней мембраны бруцелл могут быть использованы в качестве антигенов для ИФА-скрининга крупного рогатого скота угрожаемой зоны, а периплазматические белки - для плановых серологических исследований животных неблагополучных хозяйств с естественным течением инфекции. Таким образом, разработка надежных иммуноферментных бруцеллезных диагностикумов требует всестороннего изучения антигенных свойств рекомбинантных белков с целью создания мульти протеинового антигена, состоящего из комбинации нескольких белков, обладающих диагностическим потенциалом.

Список литературы

- 1 Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. The New Global Map Of Human Brucellosis // *Lancet Infect Dis.*-2006.- Vol.6.-P.91-99.
- 2 Maudlin I., Eisler M.C., Welburn S.C. Neglected and Endemic Zoonoses // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*-2009.-Vol. 364.-P.2777-2787.
- 3 Watarai M., Kim S., Yamamoto J., et al. A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads // *J Vet Med Sci.* – 2007. – Vol.69. – P.477-480.
- 4 Delpino M.V., Estein S.M., Fossati C.A., et al. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice // *Vaccine.* – 2007. – Vol.25. – P.6721-6729.
- 5 Smirnova E.A., Vasin A.V., Sandybaev N.T., et al. Current methods of human and animal brucellosis diagnostics // *Adv Infect Dis.* – 2013. – Vol.3. – P. 177-184.
- 6 P.de Wergifosse, Lintermans P., Limet J.N. and Cloeckaert A. Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol.177. – P.1911-

1914.

7 Kim G., Her M., Kang S., et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis // *Veterinary Microbiology*. – 2012. – Vol.156. – P.374-380.

8 Sowa B., Kelly K., Ficht T., et al. SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus* // *Vet Microbiol.* – 1991. – Vol.27. – P.351-369.

9 Dubray G., Bezard G. Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis // *Ann Rech Vet.* – 1980. – Vol.11. – P.367-373.

10 Gomez-Miguel M.J., Moriyon I., Lopez J. *Brucella* outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with *Escherichia coli* Braun lipoprotein and is exposed on the cell surface // *Infect Immune*. – 1987. – Vol.55. – P.258-262.

11 Mohammadi E., Golchin M. Detection of *Brucella abortus* by immune fluorescence assay using anti outer membrane protein of 19 kDa antibody // *Adv Clin Exp Med*. – 2018. – Vol.27. – P.643-648.

12 Manat Y., Shustov A.V., Evtihova E., Eskendirova S.Z. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species // *Open Veterinary*. – 2016. – Vol.6. – P.71-77.

13 Pratt A.J., DiDonato M., Shin D.S. et al. Structural, Functional, and Immunogenic Insights on Cu, Zn Superoxide Dismutase Pathogenic Virulence Factors from *Neisseria meningitidis* and *Brucella abortus* // *J Bacteriol.* – 2015. – Vol.197, №24. – P.3834-3847.

14 Tabatabai L.B., Deyoe D.L. Biochemical and biological properties of soluble protein preparations from *Brucella abortus* // *Developments in biological standardization*. – 1984. – Vol. 56. – P.199-211.

15 Булашев А.К. и соавт. ИФА-тест на основе рекомбинантного белка внешней мембраны возбудителя бруцеллеза: отчет о НИР КазАТУ им. С.Сейфуллина. Государственная регистрация № 0115RK02413, инвентарный номер 0215RK02093. – 2015. – 54с.

16 Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G // *Immunochemistry*. – 1971. – Vol. 9. – P.871-874.

17 Сайдулдин Т.С. Статистическая обработка результатов серологических реакций // *Ветеринария*. – 1981. – №7. – С.62-66.

18 Tabatabai L., Hennager S. Cattle serologically positive for *Brucella abortus* have antibodies to *B. abortus* Cu-Zn Superoxide Dismutase // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 1994. – Vol.1, -№ 5. – P.506-510.

19 Thavaselvam D., Kumar A., Tiwari S., et al. Cloning and expression of the immune reactive *Brucella melitensis* 28 kDa outer-membrane protein (Omp28) encoding gene and evaluation of the potential of Omp28 for clinical diagnosis of brucellosis // *Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 59. – P. 421-428.

20 Cloeckert A., Debbarh H.S., Vizcaino N., et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1996. – Vol.40. –

P.139-144.

21 Vizcaino N., Verger J.M., Grayon M., et al. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella spp.*: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers // *Microbiology*.- 1996.- Vol. 143 (9) - P. 2913–2921.

22 Connolly J.P., Comerci D., Alefantis T.G., et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development // *Proteomics*. - 2006. - Vol. 6 (13). - P. 3767–3780.

23 Kim H., Jeong W., Jeung H.Y., et al. Complete Genome Sequence of *Brucella abortus* A13334, a New Strain Isolated from the Fetal Gastric Fluid of Dairy Cattle // *Journal of Bacteriology*.-2012.-Vol.194 (19).-P.5444.

24 Navarro-Soto M.C., Gomez-Flores R., Morales-Loredo A., et al. Effective use of recombinant *Brucella ovis* Omp31 antigen to detect cattle serum antibodies by the ELISA indirect test // *Biotechnology Summit*. Santa María Huatulco, Oaxaca, Mexico. - 2014.-P.139–143.

REFERENCES

1 Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. The New Global Map Of Human Brucellosis // *Lancet Infect Dis*.-2006.- Vol.6.-P.91-99.

2 Maudlin I., Eisler M.C., Welburn S.C. Neglected and Endemic Zoonoses // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.-2009.-Vol. 364.-P.2777-2787.

3 Watarai M., Kim S., Yamamoto J., et al. A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads // *J Vet Med Sci*. – 2007. – Vol.69. – P.477-480.

4 Delpino M.V., Estein S.M., Fossati C.A., et al. Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice // *Vaccine*. – 2007. – Vol.25. – P.6721-6729.

5 Smirnova E.A., Vasin A.V., Sandybaev N.T., et al. Current methods of human and animal brucellosis diagnostics // *Adv Infect Dis*. – 2013. – Vol.3. – P. 177-184.

6 P.de Wergifosse, Lintermans P., Limet J.N. and Cloeckert A. Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* // *J. Bacteriol*. – 1995. – Vol.177. – P.1911-1914.

7 Kim G., Her M., Kang S., et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis // *Veterinary Microbiology*. – 2012.–Vol.156.– P.374-380.

8 Sowa B., Kelly K., Ficht T., et al. SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus* // *Vet Microbiol*. – 1991. – Vol.27. – P.351-369.

9 Dubray G., Bezard G. Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis // *Ann Rech Vet*. – 1980. –

Vol.11. – P.367-373.

10 Gomez-Miguel M.J., Moriyon I., Lopez J. *Brucella* outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with *Escherichia coli* Braun lipoprotein and is exposed on the cell surface // *Infect Immune*. – 1987. – Vol.55. – P.258-262.

11 Mohammadi E., Golchin M. Detection of *Brucella abortus* by immunofluorescence assay using anti outer membrane protein of 19 kDa antibody // *AdvClinExp Med*. – 2018. – Vol.27. – P.643-648.

12 Manat Y., Shustov A.V., Evtihova E., Eskendirova S.Z. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species // *Open Veterinary*. – 2016. – Vol.6. – P.71-77.

13 Pratt A.J., DiDonato M., Shin D.S. et al. Structural, Functional, and Immunogenic Insights on Cu, Zn Superoxide Dismutase Pathogenic Virulence Factors from *Neisseria meningitidis* and *Brucella abortus* // *J Bacteriol*. – 2015. – Vol.197, №24. – P.3834-3847.

14 Tabatabai L.B., Deyoe D.L. Biochemical and biological properties of soluble protein preparations from *Brucella abortus* // *Developments in biological standardization*. – 1984. – Vol. 56. – P.199-211.

15 Bulashev A.K. isoavt. IFA-test na osnove rekombinantnogo belka vneshnei membrany vozbuditelia brutcelleza: otchet o NIR KazATU im. S.Seifullina. Gosudarstvennaia registratsiia № 0115RK02413, inventarnyi nomer 0215RK02093. – 2015. – 54c.

16 Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G // *Immunochemistry*. – 1971. – Vol. 9. – P.871-874.

17 Saiduldin T.S. Statisticheskaya obrabotka rezultatov serologicheskikh reaktsii // *Veterinariia*. – 1981. – №7. – S.62-66.

18 Tabatabai L., Hennager S. Cattle serologically positive for *Brucella abortus* have antibodies to *B. abortus* Cu-Zn Superoxide Dismutase // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 1994. – Vol.1, -№ 5. – P.506-510.

19 Thavaselvam D., Kumar A., Tiwari S., et al. Cloning and expression of the immune reactive *Brucella melitensis* 28 kDa outer-membrane protein (Omp28) encoding gene and evaluation of the potential of Omp28 for clinical diagnosis of brucellosis // *Med. Microbiol*. – 2010. – Vol. 59. – P. 421-428.

20 Cloeckaert A., Debarh H.S., Vizcaino N., et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep // *FEMS Microbiol. Lett*. – 1996. – Vol.40. – P.139-144.

21 Vizcaino N., Verger J.M., Grayon M., et al. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella spp.*: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers // *Microbiology*. – 1996. – Vol. 143 (9) – P. 2913–2921.

22 Connolly J.P., Comerci D., Alefantis T.G., et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6 (13). – P. 3767–3780.

23 Kim H., Jeong W., Jeoung H.Y., et al. Complete Genome Sequence of *Brucella abortus* A13334, a New Strain Isolated from the Fetal Gastric Fluid of Dairy Cattle // Journal of Bacteriology.-2012.-Vol.194 (19).-P.5444.

24 Navarro-Soto M.C., Gomez-Flores R., Morales-Loredo A., et al. Effective use of recombinant *Brucella ovis* Omp31 antigen to detect cattle serum antibodies by the ELISA indirect test // Biotechnology Summit. Santa María Huatulco, Oaxaca, Mexico. - 2014.-P.139–143.

АҚУЫЗДЫҚ АНТИГЕНДЕРДІ СИЫР БРУЦЕЛЛЕЗІН БАЛАУДА ҚОЛДАНУ

*А.Қ. Бұлашев, Ө.С. Әкібеков,
Ж.Ә. Сұраншиев, А.С. Сыздыкова,
Б.Қ. Іңірбай*

*АО «С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» АҚ
Жеңіс даңғылы, 62, Нұр-Сұлтан қ.*

Түйін

Жұмыс барысында бруцелла жасушаларының сыртқы мембраналық және периплазматикалық белоктарының, сондай-ақ табиғи экстрагацияланатын белоктық компоненттерінің иммуногендігі мен антигенділігін зерттеу нәтижелері сипатталған.

Аталмыш патогеннің жасушалық қабырғасының сыртқы мембранасының белоктары қауіп төндіретін аймақтағы жануарларды тексеруге арналған ИФТ-сыналымында антиген ретінде, ал периплазматикалық ақуыздар - бруцеллез инфекциясына ұшыраған шаруашылықтардың малдарын серологиялық зерттеу үшін пайдаланылуы мүмкін. Сондықтан тиімділігі жоғары бруцеллезді балауға арналған диагностикаларды әзірлеу үшін бінеше қоздырғыштың белоктарының құрамасынан тұратын мультипротеинді антигендерді пайдалану қажет.

Кілттік сөздер: бруцеллез, *Brucella spp.*, рекомбинантты белоктар, антигенділік, иммуногенділік, серология, ИФТ, сиыр, балау.

USE OF PROTEIN ANTIGENS FOR SERODIAGNOSIS OF CATTLE BRUCELLOSIS

*A.K. Bulashev, O.S. Akibekov,
Zh. A. Suranshiev, A.S. Syzdykova,
B.K. Ingirbay*

S.Seifullin Kazakh Agronomical University, Zhenisavenue, 62, Nur-Sultan,

Summary

Traditional serological tests as well as commercial ELISA-kits used in the diagnosis of brucellosis identify antibodies using an antigen prepared from smooth(S) *Brucella* cells, the main component of which are lipopolysaccharides. For this reason, these tests may give false positive results due to cross-reactions with other gram-negative bacteria. The aim of this research was to study of the immunogenicity of *Brucella* recombinant proteins and soluble protein preparations in mice, as well as their antigenicity using blood sera samples of cows positive to brucellosis by SAT, RBPT and CFT. The used recombinant outer membrane and/or periplasmic proteins possessed immunogenicity, i.e. the ability to elicit an immune response in the form of antibody formation. Based on the results of ELISA testing blood serum of cattle, positive to brucellosis according to the results of traditional serological tests, the authors concluded that recombinant proteins can significantly increase the specificity of the assay by eliminating false-positive reactions.

Keywords: brucellosis, *Brucella spp.*, recombinant proteins, antigenicity, immunogenicity, diagnosis, ELISA