

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) = Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2018. - №4 (99). - С.107-114

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОСТИ ХИМЕРНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА БРУЦЕЛЛ В ИФА

Турсунов К.А., Іңірбай Б.К.

Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, проспект Победы

Аннотация

В данной статье представлены результаты по изучению антигенности химерного белка, состоящего из наиболее иммунодоминантных участков белков внешней мембраны (БВМ) двух видов бруцелл: *Brucella abortus* и *Brucellamelitensis* молекулярной массой (мол.м.) 31 кДа. Проведены сравнительные исследования сывороток крови крупного рогатого скота (КРС), положительно реагирующего на бруцеллез по классическим серологическим реакциям, в непрямом иммуноферментном анализе (н-ИФА) на основе рекомбинантных БВМ с мол.м. 25 кДа (рБВМ25), 31 кДа (рБВМ31) и химерного белка (рБВМВмВа), а также экстрагированного белкового антигена (ЭБА) из клеток *B. abortus* 19. Сделано заключение о том, что использование в н-ИФА одного рекомбинантного белка, значительно снижает чувствительность теста, по сравнению с химерным белком.

Ключевые слова: бруцеллез, *Brucella abortus*, *Brucellamelitensis*, химерный белок, рекомбинантные белки, антигенность, н-ИФА, антитела, диагностика.

Введение

Бруцеллез, как один из самых распространенных зоонозов в мире, является особо опасной и социально значимой инфекцией, наносящей значительный экономический ущерб животноводству [1]. Только 17 стран сообщили ВОЗ, что их территория свободна от бруцеллеза. В мире ежегодно регистрируется более 500 000 случаев впервые выявленного бруцеллеза среди людей [2,3]. Естественным резервуаром бруцелл в природе являются сельскохозяйственные животные. Соответственно, эпидемиология

бруцеллеза целиком определяется его эпизоотологией, а инфекция является типичным антропозоонозом. Возросшая в последние два десятилетия миграция населения, недостаточный ветеринарно-санитарный контроль за ввозом животных из стран неблагополучных по бруцеллезу, включая сопредельные государства СНГ, осложнили и без того напряженную эпизоотическую и эпидемическую ситуацию по этой инфекции в Республике Казахстан. В большинстве регионов страны

вследствие эпизоотического неблагополучия по бруцеллезу и нарушений ветеринарно-санитарных норм, а также правил при ведении животноводства, данная инфекция остается основной причиной экономических потерь в животноводческой отрасли, что усугубляется заболеванием людей, которое нередко приводит к потере трудоспособности и инвалидности.

Недостаточная эффективность бактериологического метода и низкая специфичность официальных серологических реакций не всегда позволяют своевременно выявить животных, зараженных бруцеллезом, что диктует необходимость совершенствования диагностики. Одним из подходов в повышении чувствительности и специфичности серологических тестов, является использование в них в качестве антигена белков внешней мембраны

Материалы и методы исследований

Приготовление рБВМ. Клетки *E. coli* BL21(DE3) - штаммов продуцентов рБВМ выращивали в жидкой или агаризованной среде, состоящей из 1% бакто-триптона (AppliChem, Германия), 0,5% дрожжевого экстракта (AppliChem, Германия) и 1% NaCl (AppliChem, Германия) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл (Синтез, Курган, Россия). Целевые продукты: рБВМ25, рБВМ31 и рБВМВмВа очищали с помощью металл-аффинной хроматографии.

Наработку бактериальной массы V. abortus проводили на мясопептонном агаре с добавлением глицерина (Sigma, Малайзия), глюкозы (Sigma, США), эритрола

(БВМ) бруцелл [4,5]. На современном этапе технология получения рекомбинантных БВМ (рБВМ) открывает новые перспективы в разработке и создании диагностических препаратов нового поколения при ряде многих инфекционных заболеваний, в том числе бруцеллеза.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение диагностической ценности ранее полученных нами рБВМ *Brucella abortus* мол.м. 25 кДа (рБВМ25), *Brucella melitensis* мол.м. 31 кДа (рБВМ31) [6] и рБВМ с молекулярной массой (мол.м.) 37 кДа (рБВМВм-Ва). Последний является химерным белком, состоящим из иммунодоминантных участков БВМ *B. abortus* и *B. melitensis* с мол.м. 31 кДа, и синтезируется штаммом-продуцентом *Escherichia coli*, который защищен патентом РК [7].

(Sigma-Aldrich, Германия), L-цистеина (Serva, Германия) и дрожжевого экстракта (AppliChem, Германия).

Приготовление экстрагируемого белкового антигена (ЭБА) из клеток *V. abortus* проводили по методу L. Tabatabai и B. Deуое (1984) [8]. Принцип метода основан на элюировании БВМ 0,1М раствором цитрата натрия, содержащий 1М хлорида натрия и 0,1% тритон X-100.

Образцы сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) в количестве 174 гол., положительно реагирующего на бруцеллез по реакции агглютинации (РА), роз бенгал пробе (РБП) и/или реакции

связывания комплемента (РСК), и 24 коров, подвергнутых послеубойному бактериологическому исследованию, были любезно предоставлены Республиканской ветеринарной лабораторией и Национальным центром мониторинга и референции в ветеринарии МСХ РК. Для определения порогового значения оптической плотности (ПЗОП) реакционной жидкости при постановке непрямого ИФА (н-ИФА) были использованы сыворотки крови 19 телок, содержащихся в молочно-товарной ферме ПК «Родина», Акмолинской области, длительное время благополучной по бруцеллезу.

Определение антител в сыворотке крови КРС к белковым антигенам бруцелл в н-ИФА осуществляли следующим образом. Лунки полистиролового планшета (ThermoFisherScientific, США) сенсibilизировали рБВМ31, рБВМ25, рБВМВм-Ва и ЭБА бруцелл в концентрации 5,0 мкг/мл в 0,1М бикарбонатном буфере с рН 9,6. Планшет закрывали крышкой и инкубировали при 4°C в течение 18 часов. После чего содержимое лунок планшета удаляли и отмывали шесть раз по 1-2 мин, заполняя лунки до верхнего края забуференным физиологическим раствором (ЗФР)-Твином (Тв). Активные центры твердой фазы нейтрализовали 1% раствором бычьим сывороточным альбумином. Далее, в лунках готовили разведения исследуемой, а также контрольных (положительных и отрицательных) сывороток в ЗФР-Тв, начиная с разведения 1:100, и выдерживали 1 час при 37°C. Затем отмывали планшеты и в лунки

вносили рабочее разведение антител против IgG КРС, меченые пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) в ЗФР-Тв. Через 1 час после выдерживания планшета в термостате (37°C) повторяли процедуру отмывки для удаления несвязанного конъюгата, а затем в лунки вносили раствор субстрата - ортофенилендиамин (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). Планшет закрывали крышкой и выдерживали 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). Для ПЗОП при постановке н-ИФА определяли среднее значение оптической плотности (ОП) образцов сывороток крови КРС с негативными результатами на бруцеллез в разведении 1:200, и за ПЗОП взяли показатель, превышающий среднее значение ОП контрольной пробы не менее чем в два раза [9].

Бактериологический анализ и ПЦР («Бру-Ком», ФБУ ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) образцов патологического материала серопозитивных коров, подвергнутых послеубойному исследованию, проводились на базе Национального центра мониторинга и референции в ветеринарии МСХ РК.

Статистическая обработка результатов серологических исследований проводилась по методике, описанной Сайдулдиным Т.С. [10].

Результаты исследований

Для определения значения ПЗОП в н-ИФА использовали образцы сывороток крови 19 гол. телок, отрицательно реагирующих на бруцеллез по результатам РА, РСК и РБП. Средние значения ОП₄₉₂ сывороток с отрицательными результатами на бруцеллез при титре 1:200 составляли 0,119±0,005; 0,078±0,003; 0,059±0,003 для н-ИФА/ЭБА, н-ИФА/рБВМ25 и н-ИФА/рБВМ31, соответственно. Исходя из этих данных, значения ПЗОП при использовании указанных

антигенов были определены на уровне 0,238; 0,156 и 0,118, что в два раза выше среднего показателя ОП₄₉₂ отрицательных сывороток, соответственно.

Результаты изучения антигенности монопротеиновых рекомбинантных белков - рБВМ25 и рБВМ31, а также природного ЭБА бруцелл н-ИФА на образцах сывороток крови 65 голов КРС, реагирующего на бруцеллез по результатам традиционных реакций, показаны в таблице 1.

Таблица 1 - Антигенность белков бруцелл н-ИФА против антител КРС (n=65), серопозитивного на бруцеллез по РА, РСК и/или РБП

Белки бруцелл, использованные в н-ИФА	Положительный результат (гол./%)	Отрицательный результат (гол./%)	Средний титр антител в н-ИФА	Достоверность различий между титрами антител против белковых антигенов бруцелл в н-ИФА	P
рБВМ31	14/21,5	51/78,5	1:120 (+0,7%; - 0,7%)	рБВМ31-рБВМ25	<0,001
				рБВМ31-ЭБА	<0,001
рБВМ25	36/55,4	29/44,6	1:160 (+2,5%; - 2,2%)	рБВМ25-рБВМ31	<0,001
				рБВМ25-ЭБА	<0,001
ЭБА <i>B. abortus</i>	59/90,8	6/9,2	1:750 (+11,7%; - 10,4%)		

Из таблицы 1 следует, что рБВМ25 по своей антигенности превосходит рБВМ31. Так, например, положительные результаты н-ИФА/рБВМ25 были установлены у 36 (55,4%) коров, тогда как использование в иммуноанализе рБВМ31 позволило обнаружить анти-*Brucella* антитела в сыворотке крови только у 14 (21,5%) гол. Положительные результаты н-ИФА/рБВМ31 подтверждались н-ИФА/рБВМ25, однако у 1 гол. (1,5%) наличие специфических

антител было установлено только в н-ИФА/рБВМ31. Необходимо отметить, что при серологическом исследовании КРС на бруцеллез наибольшую чувствительность показал н-ИФА/ЭБА *B. abortus*, который выявил антитела у 90,8% исследованного поголовья. Кроме того, положительные реакции в данном варианте иммуноанализа отмечались в более высоких титрах, нежели при использовании рБВМ31 и рБВМ25.

Диагностическая ценность

химерного рБВМВм-Ва была испытана в сравнении с рБВМ31 и рБВМ25, а также ЭБА бруцелла образцах сывороток крови 109 гол. КРС, не подвергнутого вакцинации, но положительно реагирующего на бруцеллез по комплексу традиционных реакций. Для определения ПЗОП н-ИФА/БВМВм-Ва были использованы сыворотки крови 19 телок, не содержащие антитела против *V. abortus*. Среднее значение ОП₄₉₂ отрицательных

сывороток находилось в пределах $0,060 \pm 0,004$ при 1: 200-кратном разведении, а значение ПЗОП было определено на уровне 0,120, что в два раза выше среднего ОП₄₉₂ отрицательных сывороток, соответственно.

Результаты серологических исследований КРС на бруцеллез в н-ИФА с использованием вышеупомянутых антигенов приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты тестирования позитивных на бруцеллез сывороток крови КРС (n=109) в н-ИФА с использованием белковых антигенов бруцелл

Антигены	Количество реагирующих на бруцеллез животных		Титр антител и количество серопозитивных животных в н-ИФА					
			1:100-1:200		1:400-1:800		1:1600-1:3200	
	n	%	n	%	n	%	n	%
ЭБА <i>V.abortus</i>	87	79,8	30	27,5	38	34,8	19	17,4
рБВМ25	79	72,5	61	56,0	18	16,5	0	0
рБВМ31	53	48,6	53	48,6	0	0	0	0
рБВМ Вм-Ва	87	79,8	27	24,8	60	55,0	0	0

Как видно из таблицы 2, антитела определенной части животных, серопозитивной по результатам классических тестов, в н-ИФА не связывались с использованными рекомбинантными белками, а также с ЭБА *V.abortus*. Более того, антигенность рекомбинантных белков была неодинаковой. Самая высокую антигенную активность показал ЭБА *V.abortus* и рБВМВм-Ва, которые выявили противобруцеллезные антитела в сыворотке 87 (79,8%) гол. животных. рБВМ25 и рБВМ31 были распознаны сывороточными

антителами 79 (72,5%) и 53 (48,6%) животных соответственно. Следует отметить, что все положительные результаты н-ИФА/рБВМ25 и/или н-ИФА/рБВМ31 были подтверждены иммуноанализом на основе химерного рекомбинантного белка, причем титры антител были выше, когда в качестве антигена был использован рБВМВм-Ва. Например, антитела против химерного рекомбинантного антигена были обнаружены в сыворотках крови 60 гол. (55,0%) в титрах от 1:400 до 1:800, тогда как такой уровень антител к рБВМ25 был установлен только у 18 гол

(16,5%), а к рБВМ31 антитела в таких титрах не были обнаружены.

Средние титры противобруцеллезных антител в сыворотке крови животных приведены в табл.3.

Таблица 3 – Средние титры антител КРС в н-ИФА против белковых антигенов бруцелл

Антигены	Средний титр антител сыворотки	Достоверность различий между титрами антител против белковых антигенов бруцелл в н-ИФА	
		Виды антигенов	P
ЭБА <i>V. abortus</i>	1:530 (+10,2; -9,3)	ЭБА <i>V. abortus</i> - рБВМ25	<0,001
		ЭБА <i>V. abortus</i> - рБВМ31	<0,001
рБВМ25	1:190 (+4,2; -4,0)	рБВМ25 - рБВМ31	<0,001
		рБВМ25 - рБВМВм-Ва	<0,001
рБВМ31	1:110 (+1,4; -1,4)	рБВМ31-рБВМВм-Ва	<0,001
рБВМВм-Ва	1:370(+4,2; -4,0)	рБВМВм-Ва - ЭБА <i>V. abortus</i>	<0,01

Средние титры антител в н-ИФА с использованием рБВМВм-Ва, рБВМ25 и рБВМ31 были равны 1:370 (+4,2%,-4,0%), 1:190 (+4,2%,-4,0%) и 1:110 (+1,4% -1,4%), соответственно. Была обнаружена сильная корреляционная связь

между результатами н-ИФА/рБВМВм-Ва – н-ИФА/рБВМ25 ($r=0,94$) и н-ИФА/рБВМВм-Ва – н-ИФА/рБВМ31 ($r=0,85$) (таблица 4).

Таблица 4 – Коэффициенты корреляции результатов н-ИФА на основе белковых антигенов бруцелл

Антигены	Коэффициенты корреляции(r)			
	рБВМВм-Ва	рБВМ25	рБВМ31	ЭБА <i>V. abortus</i>
рБВМВм-Ва	1	0,94	0,85	0,63
рБВМ25	0,94	1	0,85	0,59
рБВМ31	0,85	0,85	1	0,49
ЭБА <i>V. abotrus</i>	0,63	0,59	0,49	1,0

Средняя корреляция наблюдалась между показаниями н-ИФА/ЭБА *V. abortus* и н-ИФА/рБВМВм-Ва ($r=0,63$), рБВМ25 ($r=0,59$) и рБВМ31 ($r=0,49$).

Для определения достоверности результатов н-ИФА/рБВМВм-Ва проводился

бактериологический анализ патологического материала (образцы селезенки, печени и лимфатических узлов), взятого от 24 коров, положительно реагирующих на бруцеллез по данным РА и/или РСК, во время санитарного убоя. Присутствие в сыворотке крови

противобруцеллезных антител в титрах от 1:200-1:400 было подтверждено н-ИФА/рБВМВм-Ватолко у 15 животных (62,5%). Культура *B. abortus* была выделена из патологического материала от 6 голов с положительными результатами как по классическим реакциям, так и н-ИФА. ПЦР

подтвердила наличие ДНК *Brucella*spp. во всех шести культурах-положительных образцах. Таким образом, культура патогена была выделена у животных с положительными результатами общеизвестных серологических реакций и н-ИФА/рБВМВм-Вав 25% и 40% случаях, соответственно.

Обсуждение полученных результатов и заключение

Изучение антигенности белковых препаратов показало, что наибольшую активность в н-ИФА имеют химерный рБВМВм-Ва и природные ЭБА, полученные из клеток *B. abortus* методом L.Tabatabai и В.Девое(1984)[8]. Однако, следует подчеркнуть, что не все животные, реагирующие на бруцеллез по традиционным реакциям, давали положительные результаты по н-ИФА на основе белковых препаратов. Это, вероятно, демонстрирует более высокую специфичность белков *Brucella* по сравнению с ее липополисахаридами (ЛПС) - основным компонентом единого бруцеллезного антигена, используемого в традиционных серологических реакциях. Нельзя не отметить, что ЭБА бруцелл также не лишены полисахаридов клеточной стенки. Поэтому, этот антиген может взаимодействовать и с антителами, индуцированными ЛПС гладких вакцинных штаммов бруцелл и/или другими грамотрицательными бактериями. В этой связи, мы склонны считать, что более объективную диагностику бруцеллеза можно достичь при использовании в ИФА рекомбинантных белков патогена.

Следует отметить, что рБВМ25 и рБВМ31 не всегда одновременно связывались с антителами одного и того же серопозитивного животного из стационарного очага бруцеллеза. Видимо, использование отдельных рекомбинантных белков, хотя и придает анализу специфичность, снижает чувствительность ИФА-теста. На наш взгляд, более чувствительные серологические тесты могут быть разработаны на основе использования не одного отдельно взятого белка, а нескольких рекомбинантных белков бруцелл, обладающих выраженной антигенностью. Этот подход требует наличия нескольких штаммов-продуцентов, синтезирующих диагностически важные белки бруцелл. Однако, с нашей точки зрения, более рациональным путем решения этой проблемы является создание одного штамма, который будет вырабатывать иммунодоминантные участки двух или более БВМ, что значительно повысит эффективность диагностики бруцеллеза за счет снижения стоимости серологического теста и повышения его надежности. Исходя из этих соображений, нами был создан штамм микроорганизма *E.*

*coli*BL21(DE3)/pET32 – продуцент химерного белка рБВМВm-Ва, состоящего из наиболее иммунодоминантных участков БВМ двух видов бруцелл: *B. abortus* и *B. melitensis* мол.м. 31 кДа. Выбор данного белка объясняется тем, что он может быть использован в серологической диагностике не только бруцеллеза КРС, но и мелкого рогатого скота. Штамм депонирован в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК под номером № В-РКМ 0741.

Использование в н-ИФА химерного рБВМВm-Ва существенно повысило чувствительность теста по сравнению с его вариантами на основе других белковых препаратов. Так, например, химерный белок, не уступая по своей антигенности рБВМ25 и рБВМ31, дополнительно детектировал присутствие противобруцеллезных антител у 7,3% и 31,2% животных, соответственно. Относительно высокую антигенность рБВМВm-Ва, по всей вероятности, можно объяснить более высокой плотностью диагностически важных эпитопов в структуре химерного белка и лучшей доступностью их для специфических анти-*Brucella* антител, чем в составе оригинального белка.

Сравнительное исследование диагностической ценности н-

ИФА/рБВМВm-Ва и традиционных тестов на образцах сывороток крови коров, подвергнутых послеубойному бактериологическому исследованию, показало более высокую надежность иммуноферментного анализа с использованием химерного рекомбинантного белка бруцелл. Так, например, среди животных, серопозитивных по традиционным тестам, только 62,5% (15/24) были положительными в н-ИФА/рБВМВm-Ва, а его результаты нашли подтверждение в 6 (40%) случаях из 15. Хорошо известно, что, хотя выделение возбудителя от хозяина является золотым стандартом в диагностике бруцеллеза, бактериологический анализ имеет низкую чувствительность и отчасти может давать неоднозначные результаты [11]. Поэтому специфичность серологического теста не может определяться изоляцией культуры возбудителя, потому что некоторые животные, отрицательно реагирующие на бруцеллез по результатам бактериологического анализа, фактически могут быть заражены бруцеллами [12, 13]. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости продолжения научных исследований с целью широкого испытания потенциала химерного белка рБВМВm-Ва в серологической диагностике бруцеллеза животных.

Список литературы

1. OIE. Terrestrial Manual. Bovine brucellosis. – 2012. – Vol. 1. – P.616-650.
2. Seleem M.N., Boyle S.M., Sriranganathan N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis // Vet. Microbiol. – 2010. – Vol. 140. – № 3-4. – P.392-398.

3. Plumb G.E., Olsen S.C., Buttke D. Brucellosis: “One Health” challenges and opportunities // *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* – 2013. – Vol. 32. – № 1. – P.271-278.
4. Ahmed I.M. et al. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay // *BMC Vet. Res. BMC Veterinary Research.* – 2015. – Vol. 11. – № 1. – P.1-10.
5. Simborio H.L.T. et al. Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis // *Microb. Pathog. Elsevier Ltd.* – 2015. – Vol. 83-84. – P.41-46.
6. ИФА-тест на основе рекомбинантного белка внешней мембраны возбудителя бруцеллеза: отчет о НИР (промежуточный) / КазАТУ им. С.Сейфуллина: рук. Булашев А.К.; исполн.: Киян В.С., и др. – 2015. – 54 с. – № Госрегистрации: 0115РК02413. – Инв. № 0215РК02093.
7. Патент №33124 Республика Казахстан, С12N 15/00 (15/09). Штамм микроорганизма *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET32/OmpVm-Va продуцент рекомбинантного химерного белка внешней мембраны бруцелл. Заявка № 2017/0451.1 от 25.05.2017.
8. Tabatabai L.B., Deyoe B.L. Biochemical and biological properties of soluble protein preparations from *Brucella abortus* // *Dev. Biol. Stand.* – 1984. – Vol. 56. – P.199-211.
9. Bulashev A.K., Jakubowski T., Tursunov K., Kiyon V., Zhumalin A. Immunogenicity and antigenicity of *Brucella* recombinant outer membrane proteins // *Veterinarija ir zootechnika.* – 2018. – Т. 76(98). – P.17-24.
10. Сайдулдин Т.С. Статистическая обработка результатов серологических реакций // *Ж. Ветеринария.* – 1981. – №7. – С.62-66.
11. Kaltungo B.Y.: A review on diagnostic techniques for brucellosis // *African Journal of Biotechnology.* – 2014. – Vol.13. – P.1-10.
12. Cannon R.M. and Roe R.T. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians // Australian Bureau of Animal Health, Canberra. – 1982. – P.35.
13. Martin S.W. The evaluation of tests // *Can. J. comp. Med.* – 1977. – Vol. 41. – P.19-25.

References

1. OIE. Terrestrial Manual. Bovine brucellosis. – 2012. – Vol. 1. – P.616-650.
2. Seleem M.N., Boyle S.M., Sriranganathan N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis // *Vet. Microbiol.* –2010. – Vol. 140. – № 3-4. – P.392-398.
3. Plumb G.E., Olsen S.C., Buttke D. Brucellosis: “One Health” challenges and opportunities // *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* –2013. –Vol. 32.–№ 1. –P.271-278.
4. Ahmed I.M. et al. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay // *BMC Vet. Res. BMC Veterinary Research.* – 2015.– Vol. 11. – № 1. –P.1-10.
5. Simborio H.L.T. et al. Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of

bovine brucellosis // Microb. Pathog. ElsevierLtd. – 2015. – Vol. 83-84. – P.41-46.

6. IFA-test naosnoverekombinantnogobelkavneshneymembranyvozbuditelyabrutselleza: otchet o NIR (promezhutochnyy) / KazATUim. S.Seyfullina: ruk. Bulashev A.K.; ispoln.:Kiyani V.S., i dr. – 2015. – 54 s. – № Gosregistratsii: 0115RK02413. – Inv. № 0215RK02093.

7. Patent №33124 Respublika Kazakhstan, C12N 15/00 (15/09). Shtamm mikroorganizma Escherichia coli BL21(DE3)/pET32/OmpBm-Ba produtsentrekombinantnogokhimernogobelkavneshneymembranybrutsell. Zayavka № 2017/0451.1 ot 25.05.2017.

8. Tabatabai L.B., Deyoe B.L. Biochemical and biological properties of soluble protein preparations from Brucella abortus // Dev. Biol. Stand. –1984. –Vol. 56. – P.199-211.

9 Erdenebaatar J., Bayarsaikhan B., Watarai M., et al. Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals infected with Brucella species from those of animals infected with Yersinia enterocolitica O:9 // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2003. – Vol.10. – P. 710-714.

10.Sayduldin T.S. Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov serologicheskikh reaktsiy // Zh. Veterinariya. – 1981. – №7. – S.62-66.

11.Kaltungo B.Y.: A review on diagnostic techniques for brucellosis // African Journal of Biotechnology. – 2014. – Vol.13. – P.1-10.

12.Cannon R.M. and Roe R.T. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians // Australian Bureau of Animal Health, Canberra. – 1982. – P.35.

13. Martin S.W. The evaluation of tests // Can. J. comp.Med. – 1977. – Vol. 41. – P.19-25.

ИФТ-ДА БРУЦЕЛЛАЛАРДЫҢ ХИМЕРЛІК РЕКОМБИНАНТТЫ АҚУЫЗЫНЫҢ АНТИГЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

Турсунов К.А., Іңірбай Б.К.

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Жеңіс даңғылы

Түйін

Ақуыздық препараттардың антигенділігін зерттеу нәтижесінде жанама ИФТ–да химерлік рСМАВm-Ва және *Brucella*-дың сыртқы мембранасының табиғи ақуыздары аса белсенді екенін көрсетті. рСМА25 және рСМА31 бруцеллездің стационарлық ошағынан алынған сарысуларға оң реакция берген жануарлардың антиденелерімен үнемі бір уақытта байланыса бермейтіндігін атап өткен жөн.

Химерлік рСМАВm-Ва мен рСМА25 және рСМА31-ді жанама ИФТ-да салыстырғанда бруцеллезге қарсы антиденелердің болуын сәйкесінше 7,3% және 31,2% жоғары анықтады. Соудан кейін бактериологиялық зерттеуден

өткен сиырлардың қан сарысу үлгілерінде жанама ИФТ/химерлік рСМАВm-Ва мен дәстүрлі тесттерді салыстырмалы зерттеуде бруцеллалардың химерлік рекомбинантты ақуызын қолдана отыра жүргізген иммуноферменттік талдаудың аса жоғары сенімділігін көрсетті. Осылайша, дәстүрлі тесттер бойынша оң нәтиже берген жануарлардың арасынан жанама ИФТ/СМАВm-Ва тек 6,2%(15/24) оң нәтиже болды, ал оның нәтижелері 15 жағдайдың 6 (40%) расталды.

Алынған нәтижелер жануарлардың серологиялық диагностикасында моно ақуыздармен салыстырғанда рСМАВm-Ва химерлік ақуызын қолданудың артықшылығын дәлелдейді.

Кілтгісөздер: бруцеллез, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, химерлік ақуыз, рекомбинантты белоктар, антигендік, тікелей емес ИФТ, антиденелер, диагностика.

A STUDY OF THE ANTIGENICITY OF BRUCELLA CHIMERIC RECOMBINANT PROTEIN BY ELISA

Tursunov K.A., Ingirbay B.K.

S.Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Zhenis avenue, 62, Astana, 010011

Summary

The study of the antigenicity of proteins showed that chimeric rOmpBm-Ba and natural proteins of the outer membrane of *Brucella* have the greatest activity in indirect ELISA. It should be noted that rOmp25 and rOmp31 were not always simultaneously bound to antibodies of the same seropositive animal.

In indirect ELISA, chimeric rOmpBm-Ba, compared with rOmp25 and rOmp31, detected the presence of anti-*Brucella* antibodies by 7.3% and 31.2% more.

A comparative study of the diagnostic value of indirect ELISA/rOmpBm-Ba and traditional tests on samples of blood sera of cows subjected to post-slaughter bacteriological research showed a higher reliability of enzyme immunoassay using chimeric recombinant *Brucella* protein. For example, among animals seropositive for traditional tests, only 62.5% (15/24) were positive in indirect ELISA/OmpBm-Ba, and its results were confirmed in 6 (40%) cases out of 15.

The results obtained indicate the advantage of using the chimeric protein rOmpBm-Ba in the serological diagnosis of animal brucellosis compared to recombinant monoproducts.

Key words: brucellosis, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, chimeric protein, recombinant proteins, antigenicity, indirect ELISA, antibodies, diagnostics.