

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *BRUCELLA* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ У СЕРОПОЗИТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ

Турсунов К.А., Булашев А.К., Жумалин А.Х.

Аннотация

В данной статье представлены результаты исследований антигенности природных и рекомбинантных белков внешней мембраны бруцелл, а также изучена их иммуногенность для кроликов. Проведены сравнительные исследования сывороток крови крупного рогатого скота в реакции агглютинации (РА), реакции связывания комплемента (РСК), а также в иммуноферментном анализе (ИФА) на основе природных и рекомбинантных белков *Brucella abortus*. Титры антител против рекомбинантных белков бруцелл были определены с использованием двух методов подсчета пограничного значения оптической плотности реакционной жидкости ИФА при исследований сывороток крови телок, положительно реагирующих на бруцеллез перед первой вакцинацией.

Ключевые слова: бруцеллез, белки внешней мембраны, рекомбинантный белок, антигенность, ИФА.

Введение

Бруцеллез представляет собой мировую проблему для ветеринарии и медицины. По данным Объединенного комитета экспертов ВОЗ по бруцеллезу, эта болезнь зарегистрирована среди животных 155 стран. Вместе с тем ряд стран Европы (Англия, Дания, Германия, Финляндия, Швеция, Норвегия, Швейцария, Чехия, Словакия, Румыния), а также Япония, добились практической полной ликвидации этой болезни среди животных и людей [1].

Эпизоотическая обстановка по бруцеллезу в Казахстане остается напряженной. Среди стран СНГ по заболеваемости бруцеллезом людей Казахстан занимает второе место

после Киргизии. В последние годы в стране регистрируется ежегодно 2500 - 3500 случаев заболевания людей [2].

Борьба с бруцеллезной инфекцией слагаются из профилактических и оздоровительных мероприятий, включающих комплекс организационно-хозяйственных, ветеринарно-санитарных и специальных мер, направленные на разрыв эпизоотической цепи. Основным звеном этой борьбы является своевременное выявление источника инфекции - больного животного и уничтожение заразного начала во внешней среде (обеззараживание объектов

окружающей среды как факторов передачи) [3].

В нашей стране и за рубежом в серологической диагностике бруцеллеза широко используются такие тесты, как реакция агглютинации (РА), роз-бенгал проба (РБП) и реакция связывания компонента (РСК). В этих классических серологических тестах используются цельноклеточные антигены из S (гладких) штаммов бруцелл. Липополисахариды (ЛПС) гладких штаммов бруцелл во многом сходны с таковыми других грамотрицательных бактерий, что является причиной перекрестных реакций и, соответственно, ошибочной диагностики [4, 5]. В последнее время в диагностической практике находит свое применение тест-системы, основанные на использовании различных вариантов постановки иммуноферментного анализа (ИФА). Возрастающая популярность ИФА объясняется высокой чувствительностью и возможностью автоматизации этапов его постановки [6]. Однако, в коммерческих наборах основным антигеном также выступают ЛПС гладких штаммов бруцелл, что, на наш взгляд, может привести к неоправданному убою здоровых животных. Следовательно, имеется растущий интерес к идентификации антигена, более специфичного для

бруцелл, для выявления зараженных индивидуумов и разработки безопасных и эффективных вакцин для контроля и профилактики бруцеллеза [7, 8].

Получить антигены, свойственные для определенного вида микробной клетки - дело весьма сложное. Эта работа требует знания антигенной структуры возбудителя и разработки эффективных методов выделения диагностически важных компонентов патогена. Среди последних наибольшую перспективность имеют белки внешней мембраны (БВМ) - антигены, определяющие специфичность бруцелл [9-11].

На современном этапе развития новейшей биотехнологии одним из эффективных подходов в получении специфичных антигенов возбудителей болезней, пригодных для разработки диагностикумов или вакцинных препаратов, является создание штаммов-продуцентов рекомбинантных аналогов белков патогенов, в том числе бруцелл [12-14].

Целью работы явилось испытание антигенности рекомбинантных белков бруцелл Omp25, Omp31 и OmpBm-Ba в сравнении с природными БВМ.

Материалы и методы исследований

Штаммы бруцелл. Культура *B. abortus* 19 использовалась нами для получения бактериальной массы по методике, описанной нами ранее [15].

Штаммы-продуценты рекомбинантных белков бруцелл. В работе использованы три штамма-продуцента: *E. coli* BL21(DE3)/pET32/Omp25, *E. coli*

BL21(DE3)/pET32/Omp31, *E. coli* BL21(DE3)/pET32/OmpVm-Va, полученные в наших предыдущих исследованиях [16].

Природные БВМ бруцелл. Получение БВМ из клеток *B. abortus* 19 осуществлялась по методике Шенжанова К.Т. и соавт. (2002) [17]. Содержание белка определялось по общеизвестной методике описанной Bradford M. (1975) [18].

Рекомбинантные белки бруцелл. В работе были использованы рекомбинантные белки Omp25, Omp31 и OmpVm-Va. Последний представлял собой химерный белок, созданный из аминокислотных последовательностей белков бруцелл с молекулярной массой 25 кДа и 31 кДа.

Сыворотки. Образцы сывороток крови 65 невакцинированных телок из различных ферм, положительно реагирующих на бруцеллез по комплексу классических серологических тестов (РБП, РА и РСК), были любезно предоставлены РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» Комитет ветеринарного контроля и надзора МСХ РК. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки крови 19 телок (возраст 6-18 мес.) в непрямом ИФА, содержащихся в благополучном по бруцеллезу хозяйстве ТОО «Родина» Целиноградского района, Акмолинской области.

Определение иммуногенности белков бруцелл. Для определения иммуногенности природных БВМ и рекомбинантных белков бруцелл использовали четырех кроликов 3-4

мес. возраста. В первый день иммунизации первому животному подкожно вдоль хребта вводили 100 мкг БВМ *B. abortus* 19, второму - 50,0 мкг Omp25, а третьему - 100,0 мкг OmpVm-Va в объеме 1 мл в полном адьюванте Фрейнда, соответственно. Четвертый кролик служил контролем. На 14 и 28 дни, используя тот же способ введения антигена, инъецировали такие же дозы антигенов в смеси с неполным адьювантом Фрейнда. Через 7 дней антигены ввели без адьюванта и спустя столько же дней осуществляли забор крови. Полученную кровь выдерживали в термостате при 37°C в течение 1 ч., далее в холодильнике при 4°C в течении суток. Образовавшуюся сыворотку отделяли центрифугированием при 3000g. Титр сывороточных антител определяли в непрямом ИФА по общепринятой методике. В качестве иммуногена были использованы рекомбинантные белки, синтезированные штаммом-продуцентом *E. coli* с плазмидой pET32 в составе которой имеется вставка тиоредоксина. Для исключения детекции антител, образованных против тиоредоксина, в роли антигена в ИФА выступали рекомбинантные белки, синтезированные штаммом-продуцентом pET28c+, у которой отсутствует данная вставка. В качестве контроля использовали сыворотку крови интактного кролика.

Серологические исследования сывороток крови крупного рогатого скота в ИФА. Лунки полистиролового планшета (Thermo

Fisher Scientific, Уолтем, США) сенсibilизировали антигеном бруцелл БВМ, Omp25, Omp31 или OmpVm-Va в концентрации 5,0 мкг/мл в бикарбонатном буфере (БКБ) с pH 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, содержащим Твин-20 (ЗФР-Тв). 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 антибычьего конъюгата (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 и в лунки вносили раствор субстрата орто-фенилендиамина (ОФД) (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. Реакцию считали положительной, если средняя оптическая плотность (ОП) лунки с испытуемой сывороткой превышала пограничное значение оптической плотности (ПЗОП).

Для определения ПЗОП при постановке ИФА использовали два метода. По первому методу определяли среднее значение ОП образцов сывороток крови КРС с негативными результатами на бруцеллез в разведении 1:200, и за ПЗОП взяли показатель, превышающий среднее значение ОП не менее чем в два раза [19]. По второму методу, предложенному нами, ПЗОП определяли как удвоенное среднее значение ОП первых четырех разведений (1:100-1:800) негативной сыворотки.

Статистическая обработка результатов серологических исследований проводилась по методике, описанной Сайдулдиным Т.С. (1981) [20].

Результаты исследований

Результаты изучения иммуногенности природных БВМ и рекомбинантных белков бруцелл для кроликов приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Иммуногенность белков бруцелл для кроликов

Разведение сыворотки	Антисыворотки против								
	Omp25/ pET32	Omp Vm- Va/pET 32	БВМ <i>B.</i> <i>abortus</i>	Отрица тель- ный кон- троль	Omp25/ pET32	Omp Vm-Va /pET32	Отрица тель- ный кон- троль	БВМ <i>B.</i> <i>abortus</i>	Отрица тель- ный кон- троль
	Испытуемые на иммуногенность белки бруцелл								
	Omp25/pET28				Omp31/pET28			БВМ <i>B. abortus</i>	
1:100	2,047	2,056	0,869*	0,625	1,518	1,744	0,661	1,906	1,195
1:200	1,930	2,057	0,648	0,377	1,392	1,083*	0,412	1,922	0,695
1:400	1,736	1,903	0,447	0,253	1,245	0,708	0,253	1,852	0,388

1:800	1,351	1,593	0,290	0,152	1,002*	0,426	0,155	1,787	0,211
1:1600	1,010	1,070*	0,180	0,105	0,773	0,278	0,105	1,546*	0,146
1:3200	0,642*	0,709	0,124	0,083	0,551	0,189	0,079	1,075	0,098
1:6400	0,390	0,404	0,084	0,063	0,330	0,116	0,061	0,634	0,073
1:12800	0,256	0,256	0,071	0,060	0,209	0,093	0,050	0,393	0,068
1:25600	0,155	0,160	0,057		0,130	0,063		0,228	
1:51200	0,105	0,104	0,059		0,088	0,056		0,143	
1:102400	0,079	0,082	0,050		0,067	0,049		0,096	
1:204800	0,066	0,062	0,051		0,065	0,048		0,075	
1:409600	0,059	0,060	0,048		0,050	0,047		0,064	
1:819200	0,059	0,057	0,050		0,058	0,046		0,063	
1:1638400	0,052	0,051	0,051		0,044	0,040		0,053	
1:3276800	0,053	0,055	0,052		0,045	0,044		0,055	

Примечания:

1* - Значения ОП, показывающие титр антител

2 - При учете результатов ИФА за ПЗОП взяли показатель, превышающий среднее значение ОП отрицательного контроля в разведении 1:200 не менее чем в два раза

Как видно из таблицы 1, титр антисыворотки Omp25 против гомологичного белка составил 1:3200. Данная антисыворотка вступала в перекрестную реакцию с Omp31 до титра 1:800. Следует подчеркнуть, что антисыворотка OmpVm-Ва также вступала во взаимодействия с Omp25 до титра 1:1600, однако активность ее по отношению к Omp31 была низкой – 1:200. На природные БВМ *B. abortus* кролики реагировали продукцией антител, которые детектировались до титра 1:1600. Эти антитела распознавали Omp25 в начальном разведении сыворотки крови (1:100),

хотя до разведения 1:800 ОП антисыворотки почти в два раза превышала ОП контроля.

Среднее ПЗОП сыворотки крови телок благополучного хозяйства в непрямом ИФА с использованием природных БВМ бруцелл в титрах от 1:100 до 1:800 находилось в пределах $0,10 \pm 0,004$. В этой связи, данный титр был взят нами за отрицательный результат.

Ниже приведены результаты серологических исследований неиммунных телок неблагополучных хозяйств, положительно реагирующих на бруцеллез (табл. 2).

Таблица 2 – ИФА сывороток крови невакцинированных телок с положительными результатами в классических серологических реакциях

Титры антител в ИФА	Среднее значение ОП в титре 1:200	Номер группы	Количество животных, гол.(%)	Из них реагировало в	
				РА	РСК
1:100	0,102±0,015	I	10 (15,4%)	4 гол. (40%) 1:190 (+21,4%; -17,6%)	6 гол.(60%)
1:200	0,225±0,014	II	10 (15,4%)	9 гол. (90%) 1:160 (+12,6; -11,1%)	10 гол.(100%)
t = 5.7 при P<0,01 между титрами 1:100 и 1:200 t = 10.3 при P<0,001 между титрами 1:200 и 1:400					
1:400	0,491±0,020	III	9 (13,8%)	8 гол. (88,9%) 1:140 (+4,2%; - 4,0%)	9 гол.(100%)
1:800	0,824±0,037	IV	13 (20%)	12 гол. (92,3%) 1:190 (+9,3%; -8,5%)	11 гол. (84,6%)
t = 6,6 при P<0,01 между титрами 1:400 и 1:800 t = 7,0 при P<0,01 между титрами 1:800 и 1:1 600					

1:1600	1,335±0,073	V	12 (18,5%)	12 гол. (100%) 1:140 (+9,3%; -8,5%)	11 гол. (91,7%)
1:3200	1,499±0,093	VI	7 (10,8%)	7 гол.(100%) 1:120 (+14,9;-15,0%)	4 гол. (57,1%)
t = 1,3 при P>0,05 между титрами 1:1600 и 1:3200 t = 1,9 при P>0,05 между титрами 1: 1:3200 и 1:6400-12800					
1:6400- 1:12800	1,799±0,096	VII	4 (6,2%)	4 гол. (100%) 1:110(+47,4%;-2,7%)	3 гол. (75%)
t = 2,4 при P>0,05 между титрами 1: 1:1600 и 1:3200-12800					
1:3200- 1:12800	1,606 ±0,082	VIII	11 (16,9%)	11 гол. 1:110(+10,2%;-9,3%)	7 гол. (63,6%)
Примечания: 1 Все животные показали положительный результат по РБП 2 VIII группа составлена из животных VI и VII групп					

Серопозитивные животные были разделены на 8 групп в зависимости от титров антител. Как видно из табл. 2, 10 гол. (15,4%) были определены в первую группу как серонегативные животные по отношению к БВМ *B. abortus*. Среди них по РА и РСК имели положительные результаты 4 и 6 гол, соответственно. Следует отметить, что между показателями РА и РСК у этих животных установлена ярко выраженная отрицательная корреляционная связь с коэффициентом корреляции 0,9. Только в одном случае противобруцеллезные антитела были обнаружены обоими тестами в сыворотке крови одного и того же животного.

У поголовья II и VIII групп (55 гол. или 84,6%) антитела против БВМ бруцелл детектировались в титрах от 1:200 до 1:12800. Причем телки, с титром антител от 1:200 до 1:1600, имели агглютинирующие и комплементсвязывающие антитела в 88,9%-100% и 84,6-100% случаях, соответственно. Причем, между результатами ИФА и РА также установлена тесная положительная

корреляционная связь с коэффициентом 0,526.

Среднее значение ОП исследуемых сывороток в титре 1:200 имело тенденцию к достоверному увеличению по мере роста степени разведения, но эта закономерность отмечена до титра 1:1600 (1,335±0,073). Рост показателя экстинции между последующими титрами сывороток крови был не существенным - (1,499±0,09; 1,799±0,096; и 1,606±0,082; P>0,05). Именно у животных с титром в ИФА 1:1600 в 91,7% и 100% случаях выявлены агглютинирующие и комплементсвязывающие антитела, соответственно. Следует отметить, что среди животных с высокими титрами противобруцеллезных антител в ИФА (1:3200-1:12800) только у 63,6% обнаруживались комплементсвязывающие антитела.

Результаты исследований сывороток крови в классических серологических реакциях, а также в ИФА с использованием БВМ *B. abortus* и трех рекомбинантных белков бруцелл показаны в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнительные исследования телок в РА, РСК и ИФА на основе природных и рекомбинантных белков *B. abortus*

№ пор.	Результаты серологических исследований									
	РСК		РА				Непрямой ИФА с БВМ бруцелл			
	1:5	1:10	1:50	1:100	1:200	1:400	БВМ <i>B. abortus</i>	Омп 25	Омп 31	Омп Вм-Ва
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	++++	++++	-	++	-	-	1:200	PO	PO	PO
2	++++	++++	-	++	-	-	1:100	PO	PO	PO
3	++++	++++	-	++	-	-	1:800	1:100	PO	1:100
4	++++	++++	-	++	-	-	1:3200	PO	PO	PO
5	++++	++++	-	-	++	-	1:800	1:100	PO	1:200
6	++++	++++	-	++	-	-	1:400	1:100	PO	1:200
7	++++	++++	-	-	-	++	1:100	PO	PO	PO
8	++++	++++	-	++	-	-	1:200	1:100	PO	1:200
9	НИ	НИ	-	++	-	-	1:100	PO	PO	PO
10	-	-	-	++	-	-	1:100	PO	PO	PO
11	-	-	-	++	-	-	1:100	PO	PO	PO
12	-	-	-	-	++	-	1:3200	1:400	1:200	1:400
13	++++	++++	-	-	++	-	1:200	PO	PO	PO
14	++++	++++	-	-	-	-	1:400	1:100	1:100	1:400
15	++++	+++	-	-	++	-	1:6 400	PO	PO	PO
16	+++	+++	-	-	++	-	1:6 400	1:100	1:100	1:200
17	+++	+++	-	++	-	-	1:400	1:100	1:100	1:400
18	++++	++++	-	-	++	-	1:800	1:100	1:100	1:400
19	++++	++++	-	++	-	-	1:400	1:100	1:100	1:400
20	++++	++++	-	-	++	-	1:400	1:200	1:100	1:400
21	++++	++++	-	++	-	-	1:3200	1:100	PO	1:200
22	++++	++++	-	-	++	-	1:800	1:200	PO	1:200
23	++++	++++	-	++	-	-	1:800	1:200	PO	1:200
24	++++	++	-	-	-	-	1:200	PO	PO	PO
25	++++	++++	-	-	++	-	1:800	1:200	PO	1:200
26	++++	++++	-	-	++	-	1:1600	1:200	1:200	1:400
27	НИ	НИ	-	-	++	-	1:200	1:400	1:100	1:400
28	+++	++	-	++	-	-	1:800	1:200	PO	1:200
29	++++	++++	-	++	-	-	1:400	1:400	1:100	1:400
30	++++	++++	-	++	-	-	1:1600	1:200	1:200	1:400
31	+++	++	-	++	-	-	1:200	PO	PO	PO
32	+++	+++	-	++	-	-	1:400	1:100	PO	1:200
33	-	-	-	-	-	-	1:800	1:400	1:200	1:400
34	++++	++++	-	-	-	++	1:1600	1:100	PO	1:100
35	++++	++++	-	++	-	-	1:12800	PO	PO	PO
36	++++	++++	-	-	-	++	1:800	1:400	1:100	1:400
37	++++	++++	-	-	-	++	1:200	PO	PO	1:200
38	+++	++	-	-	-	++	1:1600	1:200	PO	1:400
39	++++	++	-	++	-	-	1:200	PO	PO	PO
40	++++	++++	-	++	-	-	1:400	1:400	PO	1:200
41	++++	++++	-	++	-	-	1:1600	1:200	PO	1:200
42	++++	++++	-	++	-	-	1:800	1:100	PO	1:200
43	++++	++++	-	++	-	-	1:800	1:100	PO	1:200
44	++++	++++	-	++	-	-	1:400	1:200	PO	1:100
45	++++	++++	-	-	++	-	1:800	1:200	PO	1:200
46	++++	++++	-	-	++	-	1:3200	1:200	PO	1:200
47	++++	++++	-	++	-	-	1:200	PO	PO	PO
48	+++	-	+++	+++	+++	++	1:1600	1:100	1:100	1:800
49	++	+	++++	++++	+++	+++	1:1600	1:100	PO	1:400
50	++	+	++++	++++	++++	+++	1:1600	1:100	PO	1:200
51	-	-	+++	+++	++	++	1:3200	PO	PO	1:400
52	++	+	++++	++++	++	++	1:1600	1:100	PO	1:200
53	++	+	-	-	-	-	PO	PO	PO	PO

54	++	+	++	-	-	-	PO	PO	PO	PO
55	-	-	++++	++++	++++	+++	1:12800	PO	PO	PO
56	++	+++	-	-	-	-	PO	PO	PO	PO
57	+++	+++	-	-	-	-	PO	PO	PO	PO
58	-	-	++++	++++	++++	+++	1:1600	PO	PO	1:400
59	+++	+++	+++	+++	++	++	1:3200	PO	PO	PO
60	++	+	+++	+++	+++	++	1:1600	PO	PO	1:400
61	++	+	++++	++++	++++	+++	1:1600	PO	PO	1:200
62	-	-	++++	+++	++	+	1:3200	PO	PO	1:100
63	-	-	+++	++	++	++	1:400	PO	PO	1:200
64	-	-	+++	+++	++	-	PO	PO	PO	PO
65	+++	+++	++	-	-	-	PO	PO	PO	PO

Примечание: PO – результат отрицательный

Данные таблицы 3 свидетельствуют о том, что у 22 гол., или 33,8%, не обнаруживались антитела против всех использованных рекомбинантных белков. Антигенность рекомбинантных белков по отношению к сывороткам крови телок, положительно реагирующих на бруцеллез по результатам классических серологических реакций, была различной. Так, среди испытуемых рекомбинантных

антигенов наибольшей антигенной активностью обладал OmpVm-Ba, который обнаруживал противобруцеллезные антитела у 43 гол., или 64,6% животных. Рекомбинантные белки Omp25 и Omp31 распознавались антителами 36 (55,4%) и 14 (21,5%) гол. животных, соответственно.

Степень антигенности рекомбинантных белков, выраженная в титрах сыворотки крови, приведена в таблице 4.

Таблица 4 – Антигенная активность рекомбинантных белков *B. abortus* в ИФА

Виды рекомбинантных белков	Количество животных в сыворотке крови которых в непрямом ИФА выявлены антитела против рекомбинантных белков бруцелл в титрах:							
	1:100		1:200		1:400		1:800	
	гол.	%	гол.	%	гол.	%	гол.	%
Omp25	18	50,0	12	33,3	6	16,7	0	0
Omp31	10	71,4	4	28,6	0	0	0	0
OmpVm-Ba	4	9,3	21	48,8	17	39,5	1	2,3

Из таблицы 4 следует, что противобруцеллезные антитела против OmpVm-Ba в ИФА детектировались в пределах титров 1:200-1:400 у 88,3% поголовья, тогда как положительная реакция по отношению к белкам Omp25 и Omp31 в указанных диапазонах разведения сыворотки крови была зарегистрирована у 50,0% и 28,6%

животных. Кроме того, у одной головы антитела, специфичные к OmpVm-Ba, выявлялись до титра 1:800.

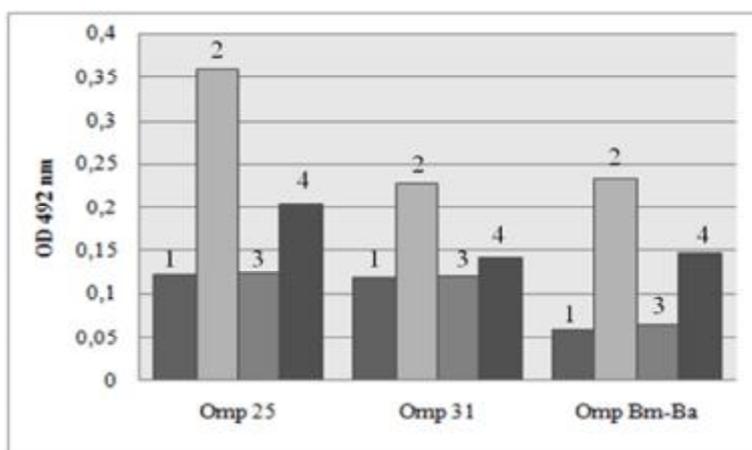
Степень корреляции между результатами ИФА при использовании природных и рекомбинантных БВМ бруцелл приведена в таблице 5.

Таблица 5 – Коэффициенты корреляции между результатами серологических тестов

Серологические тесты	Количество исследованных животных, 65 гол.					
	РСК	РА	ИФА/ БВМ <i>B.abortus</i>	ИФА/ Omp25	ИФА/ Omp31	ИФА/ OmpBm-Ba
РСК	1	- 0,168	-0,096	0,006	-0,134	0,014
РА	- 0,168	1	0,526	0,085	0,033	0,270
ИФА/БВМ <i>B.abortus</i>	-0,096	0,526	1	0,211	0,199	0,270
ИФА/Omp25	0,006	0,085	0,211	1	0,641	0,736
ИФА/Omp31	-0,134	0,033	0,199	0,641	1	0,531
ИФА/OmpBm-Ba	0,014	0,270	0,270	0,736	0,531	1

Высокая корреляционная связь ($r=0,736$) установлена между результатами ИФА/OmpBm-Ba и ИФА/Omp25. Данные ИФА/Omp31 и ИФА/Omp25, а также ИФА/OmpBm-Ba и ИФА/Omp31 находились между собой в заметной корреляционной связи: 0,641 и 0,531, соответственно.

Сравнительная антигенность рекомбинантных белков *Brucella* при использовании двух методов подсчета ПЗОП сывороток крови телок, положительно реагирующих на бруцеллез перед первой вакцинацией, показана на рисунке.



1 - ПЗОП по методике Erdenebaatar et al. (2003); 2 - ОП положительных сывороток по методике Erdenebaatar et al. (2003); 3 - ПЗОП по предлагаемой методике; 4 - ОП положительных сывороток по предлагаемой методике

Рисунок – Сравнительная антигенность рекомбинантных белков *Brucella* при использовании двух методов подсчета ПЗОП сывороток крови невакцинированного КРС, положительно реагирующего на бруцеллез

Как видно из рисунка, хотя ПЗОП двух использованных методов учета результатов ИФА находились на одном уровне, средняя ОП положительных сывороток по методике Erdenebaatar et al. (2003) была значительно выше, чем показатель средней экстинции, установленный по предлагаемой

методике. Однако для того, чтобы считать результат положительным предлагаемая нами методика требует более существенных различий между ОП испытуемой сыворотки и ПЗОП. Так, по нашей методике двукратное превышение первого показателя над вторым отмечено

только при тестировании OmpVm-Va на антигенность.

Обсуждение полученных результатов и заключение

Имеющиеся в арсенале серодиагностики бруцеллеза классические реакции, основанные на феномене агглютинации и связывания комплемента могут дать ложноположительные реакции из-за общности отдельных детерминант в составе ЛПС антигена грамотрицательных бактерий. В данной работе в качестве альтернативы к ЛПС была изучена антигенность и иммуногенность природных БВМ и рекомбинантных белков Omp25, Omp31 и OmpVm-Va. Рекомбинантные белки вызывали выраженный иммунный ответ у кроликов, причем антисыворотки вступали в кросс-реакции между собой, что свидетельствует об антигеном сходстве трех использованных антигенов. Весьма важно подчеркнуть, что антитела, полученные к OmpVm-Va - химерному белку, созданному из аминокислотных последовательностей белков бруцелл с молекулярной массой 25 кДа и 31 кДа, хорошо связывались с Omp25 (1:1600) и распознавали Omp31 в начальном разведении сыворотки крови (1:200).

Среди телок, серопозитивных по данным классических серологических реакций, 90,8% показали положительный результат в ИФА с БВМ бруцелл. При использовании в данном тесте рекомбинантных белков процент позитивных к бруцеллезу телок значительно снизился. Наибольшей антигенной активностью обладал

OmpVm-Va, который обнаруживал противобруцеллезные антитела у 64,6% телок. Два других рекомбинантных белка Omp25 и Omp31 распознавали антитела у 55,4% и 21,5% животных, соответственно. Высокая корреляционная связь ($r=0,736$) установлена между результатами ИФА/OmpVm-Va и ИФА/Omp25. Следует отметить, что между показателями РА и РСК у животных этой группы установлена ярко выраженная отрицательная корреляционная связь ($r=0,9$). Этот факт, по-всей вероятности, свидетельствует о наличии свежей инфекции среди поголовья второй группы. Приведенные результаты, на наш взгляд, подтверждают возможность получения ложноположительных результатов при использовании классических серологических реакций, которые основаны на обнаружении антител против антигенов ЛПС бруцелл. БВМ *B. abortus* также не лишены полисахаридного компонента клеточной стенки, поэтому более объективную диагностику бруцеллеза можно достичь при использовании в иммунотестах рекомбинантных белков патогена.

Таким образом, полученные нами рекомбинантные белки бактерий рода *Brucella*, как иммуногенные компоненты патогена, могут быть использованы в совершенствовании серологических методов диагностики бруцеллеза. Для

проверки этой гипотезы необходимо провести испытание диагностической ценности ИФА на основе рекомбинантных белков в сравнении с ПЦР и

бактериологическим методом диагностики бруцеллеза.

Список литературы

1. <http://medical-diss.com/medicina/brutsellez-v-rossii-sovremennaya-epidemiologiya-i-laboratornaya-diagnostika>.
2. Иванов Н.И. Бруцеллез // Ж.АгроЭлем. – 2010. – №2(7). – С.40-47.
3. Иванов Н.И. Состояние учения о бруцеллезе и мерах борьбы с ним // Ж.Ветеринария (Каз.). – 2011 – №3(19). – С.24-36.
4. Al Dahouk S., Tomaso H., Nöckler K., Neubauer H., Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis– a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis // Clin. Lab. – 2003. – Vol.49. – P.577-589.
5. Pajuaba A.C., Silva D.A.O., Almeida K.C., Cunha-Junior J.P., Pirovani C.P., Camillo L.R., Mineo J.R. Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals differential antibody profiles between S19-vaccinated and naturally infected cattle // Proteomics. – 2012. – Vol.12. – P.820-831.
6. Плотникова Э.М., Салмаков К.М., Иванов А.В. Иммуномониторинг бруцеллеза животных // Ж. Ветеринария (РФ). – 2010. – №5. – С.26-30.
7. McGiven J.A., Stack J.A., Perrett L.L., Tucker J.D., Brew S.D., Stubberfield E., MacMillan A.P. Harmonisation of European tests for serological diagnosis of *Brucella* infection in bovines // Rev. Sci. Tech. – 2006. – Vol.25. – P.1039-1053.
8. Trant C.G., Lacerda T.L., Carvalho N.B., Azevedo V., Rosinha G.M., Salcedo S.P., Gorvel J.P., Oliveira S.C. The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice // Infect Immun. – 2010. – Vol.78(5). – P.2283-2291.
9. Bundle D.R., Gidney M.A., Perry M.B., Duncan J.R., Cherwonogrodzky J.W. Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies // Infection and immunity. – 1984. – №46(2). – P.89-93.
10. Corbel M.J. Recent Advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reactions // Vet. Bull. – 1985. – Vol.55, №12. – P.927-942.
11. Corbel M.J., Cullen G.A. Differentiation of the serological response to *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus* in cattle // J. Hyg. – 1970. – Vol.68. – P.519-530.
12. Gupta V.K., Rout P.K., Vihan V.S. Introduction of immune response in mice with DNA vaccine encoding outer membrane protein (Omp31) of *Brucella melitensis* 16M // Research in Veterinary Science. – 2007. – Vol.82, №3. – P.305-313.

13. Gupta V.K., Radhakrishnan G., Harms J., Splitter G. Invasive *Escherichia coli* vaccines expressing *Brucella melitensis* outer membrane proteins 31 or 16 or periplasmic protein BP26 confer protection in mice challenged with *B. melitensis* // *Vaccine*. – 2012. – Vol.30, №27. – P.4017-4022.

14. Clause M, Dhaz A, Ghersi G. et al. The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection // *Vaccine*. – 2013. – Vol.31, №51. – P.6129-6135.

15. 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. –Инд. № 0215РК02093.

16. 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. –2016. – 85с. –№ Госрегистрации: 0115РК02413. –Инд. № 0216РК01032.

17. Пат. № 14230 Республика Казахстан, G01N 33/535. Способ определения антител против возбудителя бруцеллеза / Шенжанов К.Т., Сураншиев Ж.А., Булашев А.К, Оспанова С.Г.; заявл.22.07.2002; опубл.15.04.2008., Бюл. № 4. – 4с.

18. Bradford M.A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol.72, – P.248-254.

19. Erdenebaatar J, Bayarsaikhan B, Watarai M, Makino S and Shirahata T. 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.

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

Summary

In this paper, the antigenicity and immunogenicity of natural proteins of the outer membrane of *Brucella* spp. and its three recombinant proteins have been studied. Comparative studies of blood serum of cattle in the Agglutination Test, Complement Fixation Test, as well as in the Enzyme-linked immunosorbent assay based on the *Brucella* natural and recombinant proteins were carried out. The results of the studies showed that among heifers seropositive according to the results of classical serological tests specific antibodies to *Brucella* outer membrane proteins were detected in sera of 90.8% animals by the Enzyme-linked immunosorbent assay. Antibodies to recombinant proteins were found in serum samples of heifers in the range of 21,5% up to 64,6%.

Түйін

Осы жұмыста бруцеллалардың сырқы мембрана ақуыздары мен рекомбинантты ақуыздарының антигенділігі мен иммуногенділігі зерттелді. Ірі

қара мал қан сарысулары агглютинация, комплиментті байланыстыру және сырқы мембрана ақуыздары мен рекомбинантты ақуыздары негізінде иммунды ферменттік талдау реакцияларында салыстырмалы зерттеулері жүргізілді. Зерттеулер барысында, классикалық реакциялар бойынша серологиялық оң тайшалардың 90,8%, бруцеллалардың сырқы мембрана ақуыздарымен иммунды ферменттік талдауда оң нәтиже көрсетті. Рекомбинантты ақуыздар антиденелерді тайшалардың 21,5% - 64,6% аралығында анықтады.