

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОСТИ БЕЛКОВ БРУЦЕЛЛ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

¹А.К. Булашев, доктор ветеринарных наук, профессор

¹А.С. Сыздыкова, магистр технических наук

¹Ж.А. Сураншиев, кандидат ветеринарных наук, доцент

¹К.А. Турсунов, магистр ветеринарных наук, ассистент

²С.З. Ескендинова, кандидат ветеринарных наук, доцент

¹Казахский агротехнический университет
им. С. Сейфуллина, Астана, Казахстан

²Национальный центр по биотехнологии,
Астана, Казахстан

E-mail: aytbay57@mail.ru

Ключевые слова: бруцеллез, крупный рогатый скот, овцы, диагностика, серологические реакции, иммуноферментный анализ, белки внешней мембраны, антигенность

Реферат. *Прижизненная диагностика бруцеллеза животных основана главным образом на использовании серологических реакций, таких как РА, РБП и/или РСК. В этих тестах антитела определяются с помощью антигена, изготавливаемого из S-клеток бруцелл, главным компонентом которых являются липополисахариды (ЛПС). Последние могут быть причиной перекрестных реакций с другими клинически значимыми грамотрицательными бактериями, что приводит к получению ложноположительных результатов. В этой связи белки внешней мембраны (БВМ) бруцелл находятся в центре внимания исследователей, занимающихся совершенствованием диагностики бруцеллеза. В работе приведены результаты изучения антигенности пяти рекомбинантных белков бруцелл (рБВМ19, рБВМ25, рБВМ31, рВР26 и рСОД) и экстрагируемого белкового антигена (ЭБА) *B. abortus* и/или *B. melitensis* в непрямом иммуноферментном анализе (н-ИФА) на сыворотках крови крупного рогатого скота и овец, реагирующих на бруцеллез в классических серологических реакциях. Среди использованных белковых препаратов наиболее антигенным оказался ЭБА, который обнаруживал антитела у 94,8 % крупного рогатого скота и 69 % овец. Антитела, специфичные к рБВМ19, рБВМ25 и рБВМ31, детектировались лишь у 39; 50,6 и 76,6 % серопозитивных коров соответственно. Периплазматические белки – рВР26 и рСОД оказались менее антигенными, чем внешнемембранные, выявляя наличие анти-*Brucella* антител только у 29,9 и 14,3 % крупного рогатого скота соответственно. Рекомбинантные белки не распознавались антителами серопозитивных овец. Антитела к рекомбинантным белкам в н-ИФА обнаруживались у незначительного количества крупного рогатого скота благополучной фермы (от 2,1 до 12,5 %). Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения экспериментального заражения животных с целью объективной оценки потенциала рекомбинантных белков в диагностике бруцеллеза.*

ANTIGENICITY OF BRUCELLA PROTEINS BY THE ELISA TEST

¹Bulashev A.K., Doctor of Veterinary Sc., Professor

¹Syzdykova A.S., MSc-student of Technical Sc.

¹Suranshiyev Zh.A., Candidate of Veterinary Sc., Associate Professor

¹Tursunov K.A., MSc-student of Veterinary Sc., Assistant

²Eskendirova S.Z., Candidate of Veterinary Sc., Associate Professor

¹ S.Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Astana, Kazakhstan

²National Centre for Biotechnology, Astana, Kazakhstan

Key words: brucellosis, cattle, sheep, diagnostics, serological tests, ELISA test, outer membrane proteins, antigenicity.

Abstract. Lifetime diagnostics of animal brucellosis is mainly based on serological reactions as SAT, RBPT and CFT. The tests determine antibodies by means of antigen produced from Brucella S-cells that mainly contain lipopolysaccharides (LPS). The LPS may cause cross-reactions with other clinically significant gram-negative bacteria; this leads to false-positive results. Due to this fact, the researchers involved in improving. The paper highlights the research results on antigenicity of 5 recombinant Brucella proteins (rOMP19, rOMP25, rOMP31, rBP26 and rSOD) and soluble protein preparations (CSP) of B. abortus and/or B. melitensis by indirect ELISA using cattle and sheep serum samples positive for brucellosis by classical serological tests. CSP appeared to be the most antigenic among the protein specimens; it determined antibodies in 94.8% of the cattle and 69% of sheep. Antibodies which were specific to rOMP19, rOMP25 and rOMP31 were detected in 39%; 50.6 and 76.6% of antibody-positive cows. Periplasmic proteins (rBP26 and rSOD) were observed as less antigenic than outer membrane proteins and revealed anti-Brucella antibodies in 29.9 and 14.3% of the cattle. Recombinant proteins were not detected by antibodies of sheep positive for brucellosis. Antibodies to recombinant proteins by i-ELISA were detected in the small number of the cattle kept at brucellosis free farm (from 2.1 to 12.5%). The results obtained outline the necessity to carry out experimental infection of animals in order to assess properly the capacities of recombinant proteins when diagnosing brucellosis.

Республика Казахстан (РК) входит в десятку стран, где ежегодная заболеваемость бруцеллезом на 100 тыс. населения составляет от 8 до 50 случаев. Проблема бруцеллеза людей стоит достаточно остро и в Российской Федерации (РФ), особенно в ее кавказских регионах [1]. Кроме того, сохраняется угроза возникновения новых эпизоотических очагов в других округах РФ за счет заноса возбудителя болезни из других стран [2].

Эффективность борьбы с бруцеллезом зависит в первую очередь от своевременной диагностики. Традиционные серологические реакций (РБП, РА, РСК и др.) характеризуются низкой специфичностью из-за использования в них единого бруцеллезного антигена, изготавливаемого из S-клеток бруцелл, главным компонентом которых являются липополисахариды (ЛПС). Последние служат причиной перекрестных реакций с другими клинически значимыми грамотрицательными бактериями [3]. Тем не менее относительная легкость получения данного антигена и/или ЛПС бруцелл является привлекательным фактором для производителей традиционных диагностикумов и тестов, основанных на иммуноферментном анализе (ИФА-наборов).

В РК за пятилетний период (2008–2012 гг.) использования метода борьбы с бруцеллезом «ИФА-тест и убой» количество животных, положительно реагирующих на бруцеллез, возросло в 5–9 раз в зависимости от региона республики [4], однако улучшения эпизоотической ситуации не наступало. В настоящее время ИФА, в соответствии с ветеринарными (ветеринарно-санитарными) правилами РК, рекомендован только для серологических исследований 4–6-месячного молодняка благополучных по бруцеллезу хозяйств. Основным препятствием для широкого внедрения в диагностическую практику ИФА-наборов остается отсутствие антигена, специфичного для бактерий рода *Brucella*.

Анализ мировой литературы показывает, что среди компонентов клеточной стенки бруцелл наиболее перспективными в разработке как диагностических тестов, так и вакцинных препаратов являются белковые компоненты [5]. На современном этапе развития генной инженерии одним из эффективных подходов в получении *Brucella*-специфичных белков является создание штаммов-продуцентов рекомбинантных белков внешней мембраны (рБВМ) патогена. Так, в настоящее время изучены антигенные и иммуногенные свой-

ства рБВМ с молекулярной массой 16 кДа (рБВМ16) [6], 19 кДа (рБВМ19) [7], 25 кДа (рБВМ25) [8], 31 кДа (рБВМ31) [9], а также периплазматических белков с молекулярной массой 28 кДа (рВР26 или рБВМ28) [10] и супероксиддисмутазы (рСОД) бруцелл [11]. Однако потенциал этих белков в ИФА при серологической диагностике животных все еще остается малоизученным, и полученные результаты весьма неоднозначны, а порой и противоречивы.

Целью работы явилось изучение антигенности рекомбинантных белков бруцелл в непрямом ИФА (н-ИФА) на образцах сывороток крови крупного рогатого скота и овец, положительно реагирующих на бруцеллез в традиционных серологических реакциях.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Инактивированная бактериальная масса Brucella abortus 19 и/или Brucella melitensis Rev-1 была любезно предоставлена НПО «Антиген» (Казахстан, Алматы).

Экстрагируемый белковый антиген (ЭБА) из клеток B. abortus 19 и/или B. melitensis Rev-1 получали по методу L. Tabatabai и D. Deyoe [12], основанному на элюировании белков клеточной стенки бруцелл 0,1 М раствором цитрата натрия, содержащим 1 М хлорида натрия и 0,1 % тритона X-100.

В работе были использованы *рекомбинантные белки*, полученные в наших предыдущих исследованиях: рБВМ19 *B. abortus*, рБВМ25 *B. abortus* и рБВМ31 *B. melitensis* [13]. Синтез нуклеотидных последовательностей первого белка был выполнен компанией BioBasic (Канада), двух последующих белков – компанией Invitrogen (США). Кроме того, использовались периплазматические белки *Brucella* spp.: рВР26 [10] и рСОД [14], синтез которых был осуществлен de novo с помощью олигонуклеотидных праймеров, полученных на автоматическом ДНК-синтезаторе.

Культивирование штаммов-продуцентов и очистка рекомбинантных белков. Культуры *Escherichia coli* – штаммов-проду-

центов рекомбинантных белков – выращивали в жидкой и твердой среде Лурия-Бертани, содержащей 1 % бакто-триптона, 0,5 % дрожжевого экстракта и 1 % NaCl (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл (ОАО «Синтез», Россия). Рекомбинантный белок очищали с помощью металл-аффинной хроматографии с использованием коммерческих колонок HisTrap Columns (GE Healthcare Life Sciences, Англия) в соответствии с наставлениями производителя.

Сыворотки крови. В работе были использованы 144 образца сывороток крови крупного рогатого скота. Из них 77 образцов с положительными результатами на бруцеллез в РА и/или РБП были предоставлены ветеринарной лабораторией Житикаринского района Костанайской области. Эти сыворотки принадлежали невакцинированным коровам казахской белоголовой породы, содержащимся в хозяйстве, где произошла вспышка бруцеллеза (свежий очаг инфекции). Сорок восемь образцов сывороток крови были взяты от коров этой же породы крестьянского хозяйства «Мерке» (Бухаржырауский район, Карагандинская область), оздоровленного от бруцеллеза в 2016 г. В данном хозяйстве крупный рогатый скот подвергается вакцинации штаммом *B. abortus* 19. В качестве негативного контроля при постановке н-ИФА были использованы 19 проб сывороток крови телок молочно-товарной фермы производственного кооператива «Родина» (Целиноградский район, Акмолинская область). Данный хозяйствующий субъект длительное время благополучен по бруцеллезу и не вакцинирует поголовье скота против бруцеллеза.

Сто образцов сывороток крови овец с положительными результатами на бруцеллез по комплексу РА, РБП и/или РСК и ИФА (тест-набор фирмы ID Vet, Франция), а также 8 овечьих негативных сывороток были предоставлены РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» (НРЦВ) КВКН МСХ РК.

Определение антигенности белковых препаратов бруцелл в н-ИФА. Лунки полисти-

ролового планшета (Thermo Fisher Scientific, США) сенсibilизировали раздельно следующими антигенами бруцелл: рБВМ19, рБВМ25, рБВМ31, рВР26, рСОД и ЭБА *B. abortus* и ЭБА *B. melitensis* в концентрации 5,0 мкг/мл в 0,1М бикарбонатном буфере с рН 9,6. Планшет закрывали крышкой и оставляли в холодильнике (4 °С) на ночь, после чего содержимое лунок удаляли и отмывали 6 раз, заполняя лунки до верхнего края забуференным физиологическим раствором с добавлением Твина-20 (ЗФР-Тв). Активные центры твердой фазы блокировали 1%-м раствором бычьего сывороточного альбумина. Далее в лунках готовили разведения исследуемых и/или контрольных образцов сывороток крови 1:100 и 1:200 в ЗФР-Тв и оставляли на 1 ч при 37 °С. После отмывки планшет в лунки вносили рабочее разведение антивидовых (анти-бычьих или анти-овечьих) антител, меченых пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) в ЗФР-Тв. Через 1 ч после выдерживания планшета в термостате (37 °С) повторяли

процедуру отмывки для удаления несвязанного конъюгата. Реакцию проявляли с помощью субстрата фермента – ортофенилендиамина (Sigma-Aldrich, США). Спустя 3–5 мин в лунки добавляли равное количество 2 М серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) реакционной жидкости определяли при длине волны 492 нм с использованием планшетного ридера (Bio-Rad 680, США). Реакцию считали положительной, если показатель ОП исследуемой сыворотки (ОПис) в разведении 1:200 в два и более раз превышал среднее значение ОП контрольных сывороток (ОПкс) в этом же разведении.

Статистическая обработка цифровых данных выполнена с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показаны результаты серологических исследований коров из свежего очага бруцеллезной инфекции в н-ИФА.

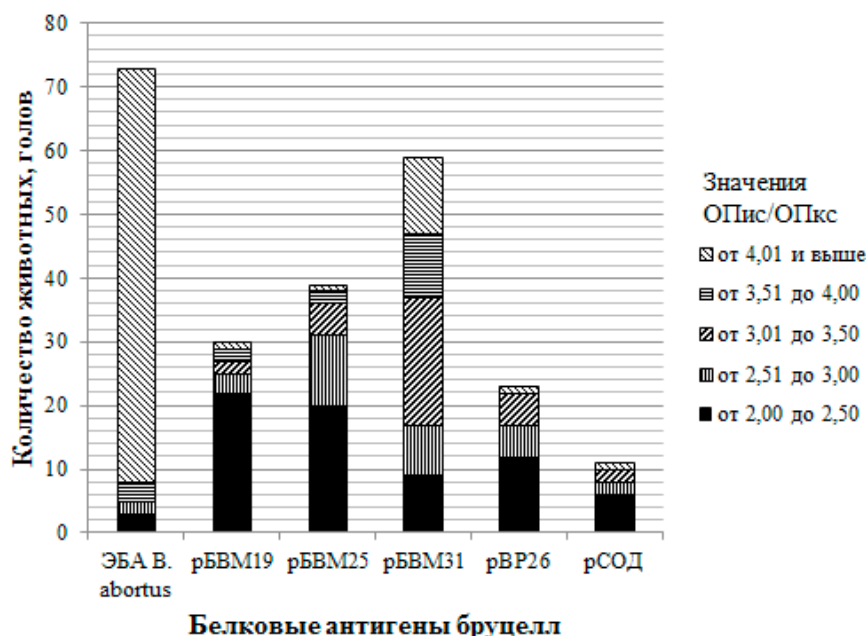


Рис. 1. Антигенность белковых препаратов в н-ИФА при исследовании сывороток крови серопозитивных коров (n=77) из свежего очага бруцеллеза
Antigenicity of protein specimens in ELISA test when exploring the blood serum of antibody-positive cows (n=77) from the epicenter of brucellosis

Данные рис. 1 демонстрируют различную антигенность белков в н-ИФА по отношению к сывороткам крови коров, положительно ре-

агирующих на бруцеллез в РА и/или РБП. Так, ЭБА *B. abortus* показал максимальную антигенность, обнаружив противобруцеллезные

антитела у 73 (94,8%) голов. Рекомбинантные белки – рБВМ19, рБВМ25 и рБВМ31 распознавались антителами лишь у 30 (39%), 39 (50,6%) и 59 (76,6%) голов соответственно.

Следует отметить, что периплазматические белки патогена: рВР26 и рСОД – оказались менее антигенными, чем внешнемембранные, детектируя наличие специфичных антител только у 23 (29,9%), и 11 (14,3%) коров соответственно. Эти различия, видимо, связаны с различной локализацией использованных белков в клетке бруцелл. Если рБВМ19, рБВМ25 и рБВМ31 являются поверхностными белками, то рВР26 и рСОД – периплазматическими, локализованными между пептидогликаном и внутренней мембраной клеточной стенки бруцелл, и поэтому менее доступными для иммунной системы, чем внешнемембранные компоненты. Поэтому у крупного рогатого скота, находящегося в свежем очаге инфекции, иммунный ответ в первую очередь развивается на белки внешней мембраны. Иммунный ответ на

«глубинные» белки развивается позже, когда возбудители болезни начинают усиленно вырабатывать СОД с целью детоксикации супероксидных радикалов, генерируемых противомикробным иммунным ответом хозяина. Мы склонны считать, что антителообразование против периплазматических белков запаздывает по сравнению с реакцией организма на белки, расположенные на внешней мембране.

Корреляционный анализ результатов различных вариантов н-ИФА показал, что между антигенностью использованных белковых препаратов не наблюдается существенной корреляционной зависимости. Умеренная корреляционная связь отмечена между результатами ИФА/рБВМ25 и его вариантами на основе рБВМ19 ($r=0,45$), рБВМ31 ($r=0,43$), рСОД ($r=0,40$) и рВР26 ($r=0,35$).

Результаты изучения антигенности белковых препаратов бруцелл в н-ИФА на сыворотках крови коров благополучного по бруцеллезу хозяйства показаны на рис.2.

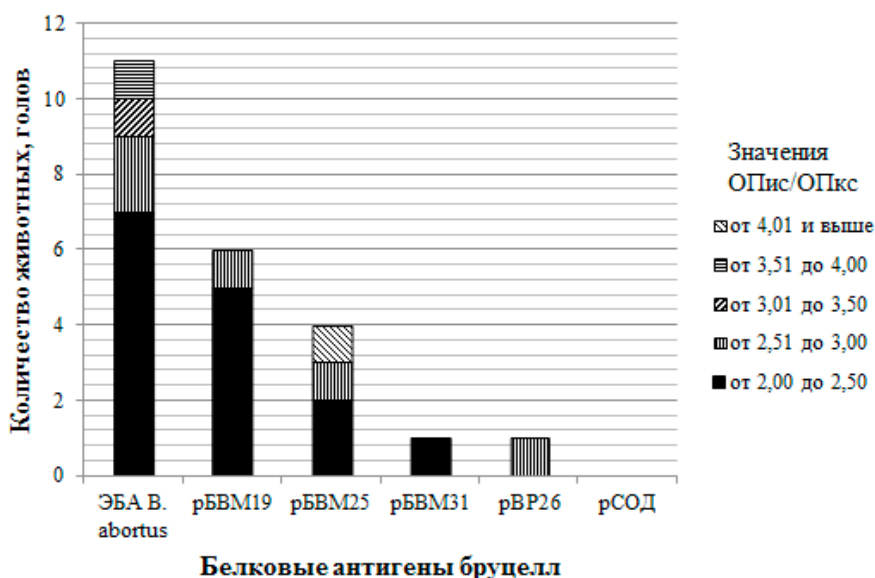


Рис. 2. Серологические показатели коров (n=48) благополучного по бруцеллезу хозяйства в н-ИФА
Serologic parameters of cows (n=48) from Brucellosis free farm by ELISA test

Среди исследованных животных 11 голов были вакцинированы за 6 месяцев, а остальное поголовье – за 11 месяцев до серологических исследований в н-ИФА. Все животные, иммунизированные за 6 месяцев до исследования, за исключением одной головы (№ 144),

показали положительные результаты по РБП (90,9%), тогда как среди 37 голов, иммунизированных за 11 месяцев до исследования, только 10 голов (27,0%) были серопозитивными по данной пробе.

Из рис. 2 видно, что антитела к ЭБА *B. abortus* были найдены у 11 голов крупного рогатого скота (22,9%). Результаты н-ИФА/ЭБА *B. abortus* и РБП совпали у 6 голов из 20, положительных по данной пробе (30,0%). Среди них 4 головы были вакцинированы за 11 месяцев и 2 за 6 месяцев до исследования в н-ИФА. Антитела к рБВМ19 и рБВМ25 были обнаружены в сыворотке крови у 6 (12,5%) и 4 голов (8,3%) соответственно. В двух случаях н-ИФА/рБВМ19 подтвердил результаты н-ИФА/ЭБА *B. abortus* и лишь в одном случае установлено совпадение показаний ИФА/рБВМ25 и н-ИФА/ЭБА *B. abortus*. Кроме того, у одной головы (2,1%) детектированы антитела к рБВМ31, а у другой (2,1%) – к рВР26. Причем у этих животных установлена положительная реакция и по н-ИФА/рБВМ25.

Таким образом, наши исследования показывают, что антитела к белковым компонентам могут вырабатываться и у вакцинированных животных. Эти данные не согласуются с результатами других исследователей, полученными на мышах. Так, на мышинной модели была описана возможность дифференциации инфицированных от вакцинированных индивидуумов с помощью н-ИФА на основе обнаружения антител против рБВМ у мышей, зараженных *B. melitensis* Rev-1 [15].

Обращает на себя внимание тот факт, что животные благополучной по бруцеллезу фермы не имели анти-СОД антител, что, на наш взгляд, является доказательством отсутствия инфекции. Интересно отметить, что если в группе крупного рогатого скота из свежего очага бруцеллеза антигенность рекомбинант-

ных белков (по количеству выявляемых животных) возрастала по мере увеличения их молекулярной массы: рБВМ19 – 39, рБВМ25 – 50,6 и рБВМ31 – 76,6%, то в группе вакцинированных животных благополучного стада наблюдалось обратное явление: 12,5; 8,3 и 2,1% соответственно.

Как и следовало ожидать, белковые препараты бруцелл более интенсивно связывались с антителами сывороток крови коров из свежего очага бруцеллезной инфекции. Об интенсивности связывания белков с антителами судили по показателям кратности превышения ОПс над средним значением ОПкс (табл. 1).

Из табл. 1 следует, что антигенность белковых препаратов бруцелл была более выраженной при тестировании сывороток крови крупного рогатого скота из свежего очага инфекции, нежели из благополучного хозяйства. Например, если у благополучного стада значение ОПс/ОПкс в н-ИФА/ЭБА *B. abortus* было равно $1,55 \pm 0,68$, то у животных из свежего очага инфекции данный показатель достиг $6,63 \pm 0,23$ ($P \leq 0,001$). Существенные различия между двумя группами животных были отмечены и по интенсивности связывания противобруцеллезных антител с рекомбинантными белками: рСОД ($P \leq 0,05$), рБВМ31 и рВР26 ($P \leq 0,01$), рБВМ25 и рБВМ19 ($P \leq 0,05$).

Антигенность ЭБА другого вида бруцелл – *B. melitensis* и рекомбинантных белков изучалась на образцах сывороток крови овец в количестве 100 гол., положительно реагирующих на бруцеллез в РА, РСК и/или РБП.

Для определения ОПкс в н-ИФА на основе рБВМ19, рБВМ25, рБВМ31, рВР26, рСОД

Таблица 1

Интенсивность связывания белковых антигенов бруцелл с антителами сывороток крови крупного рогатого скота в зависимости от эпизоотического состояния стада, ОПс/ОПкс
Binding rate of Brucella protein antigens with the serum antibodies of the cattle in relation to epizootic situation in the herd, ODts/ODcs

Эпизоотическое состояние стада	Белковые антигены бруцелл, использованные в н-ИФА					
	ЭБА <i>B. abortus</i>	рБВМ19	рБВМ25	рБВМ31	рВР26	рСОД
Благополучное по бруцеллезу (n=48)	$1,55 \pm 0,68$	$1,66 \pm 0,05$	$1,35 \pm 0,67$	$1,16 \pm 0,36$	$1,07 \pm 0,25$	$0,91 \pm 0,32$
Свежий очаг бруцеллеза (n=77)	$6,63 \pm 0,23^{***}$	$2,56 \pm 0,13^*$	$2,55 \pm 0,08^*$	$3,50 \pm 0,12^{**}$	$2,66 \pm 0,17^{**}$	$3,50 \pm 0,12^*$

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

и/или ЭБА *B. melitensis* были использованы негативные сыворотки крови 8 овец, представленные НРЦВ КВКН. Среднее значение ОПкс находилось в пределах $0,142 \pm 0,010$; $0,300 \pm 0,026$; $0,346 \pm 0,029$; $0,233 \pm 0,032$; $0,306 \pm 0,027$; $0,129 \pm 0,005$ соответственно при разведении 1:200, а предельно минимальное (пограничное) положительное значение ОПкс было определено на уровне $0,284$; $0,600$; $0,692$; $0,466$; $0,612$; $0,258$, что в два раза выше среднего ОПкс.

Результаты н-ИФА, полученные при исследовании овец, реагирующих на бруцеллез по показаниям традиционных серологических реакций и коммерческого ИФА-набора (ID Vet, Франция), обобщены в табл. 2.

Как показали результаты исследований, н-ИФА/ЭБА *B. melitensis* подтвердил положительные показания традиционных серологических реакций и коммерческого ИФА-теста у 69 голов, тогда как ни в одном случае не были обнаружены антитела, связывающиеся с рекомбинантными белками внешней мембраны и/или периплазматическими антигенами. По всей вероятности, белки клеток *B. melitensis* вызывают развитие не гуморального, а клеточного иммунитета. Кроме того, эти антитела могут иметь вакцинное происхождение и поэтому в большей мере быть направленными против ЛПС-компонента бруцелл.

Отрицательные результаты н-ИФА на основе рекомбинантных белков бруцелл при исследовании сывороток крови отдельных коров и овец, положительно реагирующих на бруцеллез в РА РСК и/или РБП, на наш взгляд, подтверждают возможность получения ложноположительных реакций при использовании единого бруцеллезного антигена, состоящего

из типичных бруцелл гладких форм. Как известно, S-ЛПС бруцелл в антигенном отношении весьма сходны с таковыми других грамотрицательных бактерий, что может быть причиной получения ложноположительных результатов при использовании традиционных серологических тестов [3]. ЭБА бруцелл, полученный нами по методике L. Tabatabai и D. Deyoe [12], хотя и считается белковым препаратом, также не лишен полисахаридного компонента клеточной стенки. Поэтому мы предполагаем, что более объективной диагностики бруцеллеза можно достичь при использовании в ИФА рекомбинантных белков патогена. Тем не менее, основываясь на результатах исследований сывороток крови серопозитивных овец, можно предположить, что ЭБА *B. melitensis* более специфичен, чем ЛПС коммерческого ИФА-набора ID Vet (Франция), поскольку н-ИФА не подтвердил наличие специфических антител в сыворотке крови у 31 % овец.

Рекомбинантные белки не всегда одновременно связывались с антителами одного и того же серопозитивного крупного рогатого скота. Кроме того, среди них не было отдельно взятого белка, который ни в одном случае не уступал бы другим белкам по своей антигенности. Следовательно, хотя использование отдельных рБВМ и придает специфичность н-ИФА, но снижает его чувствительность при серологических исследованиях животных на бруцеллез. В этой связи для повышения чувствительности иммуноанализа следует использовать не один отдельно взятый белок, а комбинацию из нескольких рекомбинантных белков. Таким образом, полученные результаты указывают на необходимость продолжения исследований по определению диагностической ценности им-

Таблица 2

Антигенность белков бруцелл в н-ИФА при исследовании сывороток крови серопозитивных овец (n=100)
Antigenicity of *Brucella* proteins in ELISA test when exploring the blood serum of antibody-positive sheep (n=100)

Показатель	Виды белковых препаратов бруцелл, использованных в н-ИФА					
	ЭБА <i>B. melitensis</i>	рБВМ19	рБВМ25	рБВМ31	рВР26	рСОД
Количество овец с положительными результатами в н-ИФА	69	0	0	0	0	0
Средние значения ОП реакционной жидкости 100 голов	$0,320 \pm 0,013^*$	$0,172 \pm 0,006$	$0,293 \pm 0,007$	$0,265 \pm 0,009$	$0,207 \pm 0,008$	$0,336 \pm 0,011$

* Среднее значение ОП у 69 голов с положительными результатами в н-ИФА составило $0,396 \pm 0,008$.

муноферментных диагностикумов на основе рекомбинантных белков бруцелл.

ВЫВОДЫ

1. Среди использованных белковых препаратов бруцелл наиболее антигенным в н-ИФА оказался ЭБА *B. abortus* и/или *B. melitensis*, обнаруживая антитела у 94,8% крупного рогатого скота и/или 69% овец, положительно реагирующих на бруцеллез в РА, РБП и/или РСК.

2. Антитела, специфичные к рБВМ19, рБВМ25 и рБВМ31, детектировались в образцах сывороток крови лишь у 39; 50,6 и 76,6% серопозитивных коров соответственно. Периплазматические рекомбинантные белки – рВР26 и рСОД – оказались менее антигенными, чем внешнемембранные, выявляя наличие анти-*Brucella* антител только у 29,9 и 14,3% серопозитивного крупного рогатого скота соответственно.

3. Периплазматический белок рСОД может быть использован в н-ИФА для дифференциации поствакцинальных антител от постинфекционных.

4. Белки внешней мембраны и/или периплазматические белки бруцелл в н-ИФА не распознавались антителами овец, положительно реагирующих на бруцеллез по показаниям традиционных серологических реакций.

5. Отрицательные результаты н-ИФА при исследовании сывороток крови животных с положительными показаниями РА, РСК и/или РБП свидетельствуют о низкой специфичности единого бруцеллезного антигена, используемого в традиционных серологических реакциях.

6. Объективная оценка потенциала рекомбинантных белков в диагностике бруцеллеза может быть дана на основе результатов экспериментального заражения лабораторных и/или сельскохозяйственных животных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Pappas G. Brucellosis in the world today [Электрон. ресурс] // HCDCP E-bulletin. – Режим доступа: <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=2033>.
2. Диагностическая ценность РИД с разными О-ПС антигенами при бруцеллезе крупного рогатого скота / П.К. Аракелян, Г.В. Разницына, Т.А. Янченко [и др.] // Ветеринария. – 2016. – № 7. – С. 25–30.
3. Humoral immune response against lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with *B. abortus* S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 / P.C. Baldi, G.H. Giambartolomei, F.A. Goldbaum [et al.] // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 1996. – Vol. 3. – P. 472–476.
4. Мониторинг и анализ эпизоотической ситуации по бруцеллезу крупного рогатого скота в Республике Казахстан за 2007–2015 годы / А.Е. Ешмухаметов, К.К. Бейсембаев, Ж.С. Асауова [и др.] // Вестн. Костанай. гос. ун-та им. А. Байтурсунова. – 2016. – № 2. – С. 36–41.
5. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis / K. Y. Ko, J. W. Kim, M. Her [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2012. – Vol. 156. – P. 374–380.
6. Cloning, Expression and Characterisation of Recombinant Outer Membrane Protein 16 from *Brucella* spp. / G. Kaur, R. Verna, B.V.S. Kumar [et al.] // Proc. Natl. Acad. – 2015. – Vol. 85. – P. 853–858.
7. Mohammadi E., Golchin M. Detection of *Brucella abortus* by immunofluorescence assay using anti outer membrane protein of 19 kDa antibody // Adv Clin Exp Med. – 2018. – Vol. 27. – P. 643–648.
8. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis*: Evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene / A. Cloeckert, J.M. Verger, M. Grayon [et al.] // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64. – P. 2047–2055.
9. Effective use of recombinant *Brucella ovis* Omp31 antigen to detect cattle serum antibodies by the ELISA indirect test / M.C. Navarro-Soto, R. Gomez-Flores, A. Morales- Loreda [et al.] // Proceedings of Biotechnology Summit. – Mexico, 2014. – P.139–143.

10. *Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of Brucella species* / Y. Manat, A. V. Shustov, E. Evtekhova, S. Z. Eskendirova // *Open Veterinary Journal*. – 2016. – Vol. 6. – P. 71–77.
11. *Structural, Functional, and Immunogenic Insights on Cu, Zn Superoxide Dismutase Pathogenic Virulence Factors from Neisseria meningitidis and Brucella abortus* / A. J. Pratt, M. DiDonato, D. S. Shin [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2015. – Vol. 197, № 24. – P. 3834–3847.
12. *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.
13. *Получение штамма продуцента рекомбинантного BBM19 Brucella abortus и изучение его антигенности* / А.К. Булашев, К.Т. Турсунов, Ж.К. Каирова [и др.] // *Вестн. КазАТУ им. С. Сейфуллина*. – 2018. – № 3. – С. 117–127.
14. *Пат. № 30873 РК, МПК C12N 15/52, C12N1/21 Рекомбинантный штамм Escherichia coli BL21 (DE3) /pET22/SOD, продуцирующий Cu/Zn-зависимую супероксиддисмутазу* / С.З. Ескендинова, А.В. Шустов, Е.Б. Евтыхова, Е. Манат; заявитель и патентообладатель Национальный центр по биотехнологии РК. – № 2014/1335.1; заявл. 17.10.2014; опубл. 25.12. 2015, Бюл. № 12. – 5 с.
15. *Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from Brucella melitensis in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay* / I. Ahmed, S. Khairani-Bejo, L. Hassan [et al.] // *BMC Vet. Res.* – 2015. – Vol. 11:275. – DOI: 10.1186/s12917-015-0587-2.

REFERENCES

1. Pappas G., *HCDCEP E-bulletin*, available at: <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=2033>
2. Arakelyan P.K., Raznitsina G.V., Yanchenko T.A., Bondarev Ye.G., Dimova A.S., Dimov S.K., Chekichev V.M., Vorob'yev V.I. *Veterinariya*, 2016, No. 7, pp.25–30. (In Russ.)
3. Baldi P.C., Giambartolomei G.H., Goldbaum F.A., Abdón L.F., Velikovskiy C.A., Kittelberger R., Fossati C.A. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1996. Vol. 3, pp.472–476.
4. Eshmuhametov A.E., Bejsembaev K.K., Asauova Zh.S., Sultanova A.O. *Vestnik Kostanajskogo gosudarstvennogo universiteta im. A. Bajtursunova*, 2016, No. 2, pp.36–41. (In Russ.)
5. Ko K.Y., Kim J.W., Her M., Kang S.I., Jung S.C., Cho D.H., Kim J.Y., *Veterinary Microbiology*, 2012, Vol. 156, pp.374–380.
6. Kaur G., Verna R., Kumar B.V.S., Deka D., Arawall R.K. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. Vol.85, pp.853–858.
7. Mohammadi E., Golchin M. *Adv Clin Exp Med.*, 2018, Vol. 27, pp.643–648.
8. Cloeckert A., Verger J.M., Grayon M., Zygmunt M.S., Grépinet O. *Infect. Immun*, 1996, Vol.64. pp. 2047–2055.
9. Navarro-Soto M.C., Gomez-Flores R., Morales- Loreda A., Ramírez-Pfeiffer C., Tamez-Guerra P., Álvarez-Ojeda G., *Biotechnology Summit*, Proceedings of the Conference, 8–10 Oct., 2014, Mexico, pp.139–143.
10. Manat Y., Shustov A. V., Evtekhova E., Eskendirova S. Z. *Open Veterinary Journal*, 2016, Vol. 6, pp. 71–77.
11. Pratt A. J., DiDonato M., Shin D. S., Cabelli D. E., Bruns C. K., Belzer C. A., Gorringer A. R., Langford P. R., Tabatabai L. B., Kroll J. S., Tainer J. A., Getzoff E. D. *Bacteriol*, 2015, Vol. 197, pp.3834–3847.
12. Tabatabai L. B., Deyoe D. L. *Developments in biological standardization*, Vol. 56, pp.199–211.
13. Bulashev A. K., Tursunov K. T., Kairova Zh.K. *Vestnik KazATU im. S. Seifullina*, 2018, No. 3, pp. 117–127. (In Russ.)
14. Eskendirova S. Z., Shustov A. V., Evtyhova E. B., Manat E., *Patent RK № 30873.*, 2014, byul. No. 12, 5 p. (In Russ.)
15. Ahmed I.M., Khairani-Bejo S., Hassan L., Bahaman A.R., Omar A.R., *BMC Vet. Res.*, 2015, Vol. 11: 275. DOI 10.1186/s12917-015-0587-2.