

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ *BRUCELLA* SPP. В ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА¹А.К. Булашев, доктор ветеринарных наук, профессор¹О.С. Акибеков, кандидат ветеринарных наук, ассоциированный профессор¹А.С. Сыздыкова, магистр технических наук¹Ж.А. Сураншиев, кандидат ветеринарных наук, доцент²С.З. Ескендинова, кандидат ветеринарных наук, доцент**Ключевые слова:** бруцеллез, крупный рогатый скот, рекомбинантные белки, диагностика, иммуноферментный анализ¹Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина,

Нур-Султан, Республика Казахстан

²Национальный центр по биотехнологии, Нур-Султан, Республика Казахстан

E-mail: aytbay57@mail.ru

*Реферат. Одним из главных звеньев в системе мероприятий по ликвидации бруцеллеза является своевременное и достоверное выявление инфицированных животных. В серодиагностике этой болезни широко используются такие реакции, как РБП, РСК (РДСК) и РА. В последнее время находят свое применение и различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА). Как в традиционных реакциях, так и в ИФА в качестве основного антигена выступают липополисахариды гладких штаммов *Brucella* spp., что затрудняет дифференциацию больных от вакцинированных против бруцеллеза животных. Кроме того, эти тесты не всегда дают объективные результаты из-за перекрестных реакций бруцелл с другими грамотрицательными бактериями. В этой связи заслуживают пристального внимания результаты исследований, посвященные определению диагностической ценности белковых компонентов патогена. В работе изучен диагностический потенциал рекомбинантных белков внешней мембраны (БВМ19, БВМ25, БВМ31) и периплазматического белка – супероксиддисмутазы (СОД) бруцелл в непрямом ИФА (НИФА). Результаты исследований показали, что коровы спустя 10 месяцев после ревакцинации шт. *B. abortus* 19 в 60 % случаев дают положительные реакции по РБП и НИФА на основе БВМ бруцелл, тогда как антитела в НИФА/СОД определяются лишь у 4 % поголовья. Около одной трети телят, содержащихся на полном подсосе вместе с ревакцинированными против бруцеллеза матерями, к 6 месяцам постнатального онтогенеза имели специфические антитела к БВМ бруцелл. Использование в НИФА отдельно взятых рекомбинантных белков снижало чувствительность теста при серологических исследованиях коров-матерей и их подсосных телят. В сыворотках крови серопозитивных коров из эпизоотических очагов бруцеллеза антитела к БВМ, а также СОД бруцелл детектировались в 96,7–100 % случаев. Таким образом, полученные результаты дают основание для продолжения исследований по определению серологического потенциала СОД в дифференциации *Brucella*-инфицированных от вакцинированных животных.*

**SEROLOGICAL POTENTIAL OF *BRUCELLA* SPP. RECOMBINANT PROTEINS
IN THE DIAGNOSIS OF CATTLE BRUCELLOSIS**¹ **A.K. Bulashev**, Doctor of Veterinary Sciences, Professor¹ **O.S. Akibekov**, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor¹ **A.S. Syzdykova**, Master of Engineering¹ **Zh.A. Suranshiyev**, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor² **S.Z. Eskendirova**, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor¹ **S. Seifullin** **Kazakh Agrotechnical University,
Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan**² **National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan**

Key words: brucellosis, cattle, recombinant proteins, diagnostics, enzyme linked immunosorbent assay.

Abstract. One of the main links in the system of measures to eliminate brucellosis is the timely and reliable identification of infected animals. In the serodiagnosis of this disease, reactions such as RBPT, CFT (RCFT) and AT are widely used. Recently, various variants of ELISA tests find their application. Both in traditional reactions and in ELISA, lipopolysaccharides of smooth strains of Brucella spp. act as the main antigen, which complicates the differentiating infected from vaccinated animals. In addition, these tests do not always give objective results due to the cross-reactions of Brucella with other gram-negative bacteria. In this regard, the results of studies devoted to the determination of the diagnostic value of the protein components of the pathogen deserve close attention. The diagnostic potential of Brucella recombinant outer membrane proteins (OMP19, OMP25, OMP31) and the periplasmic protein - superoxide dismutase (SOD) in indirect ELISA was studied. The research results showed that cows 10 months after revaccination with B. abortus 19 in 60% of cases gave positive reactions by RBPT and indirect ELISA based on Brucella OMPs, while antibodies in indirect ELISA/SOD were detected only in 4% of the population. About one third of the suckling calves kept on with their mothers revaccinated against brucellosis had specific antibodies to Brucella OMPs by 6 months of postnatal ontogenesis. The use of individual recombinant proteins in indirect ELISA reduced the sensitivity of the test in serological studies of mother cows and their suckling calves. In serum of seropositive cows from epizootic foci of brucellosis, antibodies to Brucella OMPs as well as SOD were detected in 96.7-100% of cases. Thus, the obtained results provide the basis for further research to determine the serological potential of SOD in the differentiation of Brucella-infected from vaccinated animals.

Бруцеллез является одной из наиболее распространенных зоонозных инфекций, которая негативно влияет на продуктивность скота, а в случае заражения людей ведет к пожизненной инвалидности. Ежегодно в мире регистрируется более полумиллиона новых случаев бруцеллеза человека, хотя эта цифра считается заниженной. Республика Казахстан (РК), а также шесть других бывших советских республик (Кыргызстан, Таджикистан, Азербайджан, Туркменистан, Армения и Узбекистан) входят в число 25 стран с самой высокой заболеваемостью [1]. Эпизоотическая и эпидемическая обстановка по бруцеллезу продолжает оставаться слож-

ной и на территории Северо-Кавказского, Южного и Приволжского федеральных округов Российской Федерации [2].

Своевременное выявление животных, больных бруцеллезом, является ключевым элементом в системе мероприятий по ликвидации данной инфекции. Для этой цели в РК применяют серологические реакции, рекомендованные Всемирной организацией здоровья животных: РСК или РДСК, РБП и ИФА. В этих тестах в качестве основного антигена, взаимодействующего с патоген-специфичными антителами, выступают липополисахариды (ЛПС) клеточной стенки S-штамма бруцелл. В этой связи весьма трудно дифферен-

цировать животных, иммунизированных агглютиногенными вакцинами, от естественно инфицированных индивидуумов. Более того, традиционные тесты, основанные на использовании S-ЛПС цельной клетки бруцелл, не всегда дают надежные результаты из-за перекрестной реактивности с другими грамотрицательными бактериями [3]. Поэтому в последние годы исследователи, занимающиеся разработкой бруцеллезных диагностикумов, все более пристальное внимание уделяют белковым антигенам патогена [4].

Достижения в области технологии рекомбинантных ДНК позволили изучить возможности использования белков *Brucella* spp. в качестве антигенов, чтобы избежать биологических опасностей, связанных с использованием живых штаммов. Кроме того, тесты на основе рекомбинантных белков бруцелл позволяют улучшить стандартизацию анализа по сравнению с более сложными цельноклеточными антигенными препаратами и преодолевать ограничения, связанные с использованием ЛПС [5]. Имеется сообщение о том, что непрямой ИФА (нИФА) на основе комбинированного антигена, состоящего из рекомбинантных белков внешней мембраны (БВМ) бруцелл с молекулярной массой 25, 28 и 31 кДа, способен дифференцировать зараженных мышей от аналогов, иммунизированных *Brucella melitensis* Rev1 [6]. Однако до сих пор нет единого мнения о возможности использования рекомбинантных белков бруцелл для дифференциации постинфекционных и поствакцинальных антител, выработанных иммунизированными сельскохозяйственными животными, в частности, крупным рогатым скотом. Кроме того, представляет большой теоретический и практический интерес серологическая реактивность молодняка мясных пород при содержании их под коровами, вакцинированными (ревакцинированными) против бруцеллеза.

Целью нашего исследования было определение серологического потенциала некоторых рекомбинантных белков в нИФА при исследовании крупного рогатого скота на бруцеллез.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Рекомбинантные белки бруцелл. В работе были использованы рекомбинантные белки, полученные в наших предыдущих исследованиях: БВМ25 *B. abortus* и БВМ31 *B. melitensis* [7], БВМ19 *B. abortus* [8] и периплазматический белок – супероксиддисмутаза (СОД) бруцелл [9].

Сыворотки крови. 152 сыворотки крови коров, серопозитивных на бруцеллез, были любезно предоставлены Республиканским государственным предприятием «Национальный референтный центр по ветеринарии» (НРЦВ) МСХ РК, а 253 образца крови были взяты у крупного рогатого скота казахской белоголовой породы крестьянского хозяйства (КХ) «Мереке» (Бухар-Жырауский район Карагандинской области, РК), благополучного по бруцеллезу, среди которых 151 сыворотка принадлежала коровам, а оставшиеся 102 – 6-месячным телятам, находящимся на подсосе под матерями. Коровы были вакцинированы в 2015 г. в 5–6-месячном возрасте подкожно полной дозой вакцины (80 млрд кл.) *B. abortus* 19 и в последующие три года ежегодно подвергались ревакцинации этой же вакциной конъюнктивально в дозе 8 млрд кл.

Определение противобруцеллезных антител в нИФА. Лунки полистиролового планшета (Thermo Fisher Scientific, США) покрывали отдельно рекомбинантными белками бруцелл. После отмывки твердой фазы в четырех лунках готовили разведения исследуемых образцов сывороток крови в забуференном физиологическом растворе с добавлением 0,05% твина-20 (Sigma-Aldrich, США), начиная с разведения 1:100. Далее планшет инкубировали в течение 1 ч и после процедуры отмывки в лунки вносили антибычий IgG, антитела, меченные пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США). Результаты реакций проявляли с помощью субстрата фермента ортофенилендиамина (Sigma-Aldrich, США). Реакцию считали положительной, если показатель оптической плотности (ОП) иссле-

дуемой сыворотки в 2 и более раз превышал среднее значение ОП негативного контроля в разведении 1:100. В качестве негативного контроля были использованы сыворотки крови трех быков-производителей этого же хозяйства, не вакцинированных против бруцеллеза.

Постановку роз-бенгал пробы осуществляли по методике, описанной в инструкции изготовителя (НПП «Антиген», Алматы, РК).

Статистическую обработку серологических исследований проводили по методике, описанной Т.С. Сайдулдиным [10]. Коэффициенты корреляции между результатами различных вариантов нИФА определялись с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2007 для Windows 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Диагностический потенциал рекомбинантных белков был испытан на образцах сывороток крови крупного рогатого скота благополучной фермы, использующей вакцинацию против бруцеллеза, и на положительных сыворотках крови коров из хозяйств, где бруцеллез был диагностирован в ходе плановых исследований районными ветеринарными лабораториями и подтвержден НРЦВ РК.

В табл. 1 показаны результаты исследований сывороток крови 151 коровы КХ «Мереке» в РБП и нИФА на анти-*Brucella* антитела через 10 месяцев после третьей ревакцинации шт. *B. abortus* 19.

Из табл. 1 видно, что более чем у половины поголовья (61–62%), реиммунизированной

Таблица 1

Результаты серологических исследований ревакцинированных коров благополучной по бруцеллезу фермы (n=151)

The results of serological studies of revaccinated cows of a brucellosis-free farm (n = 151)

Показатель	РБП	нИФА на основе рекомбинантных белков <i>Brucella</i> spp.			
		БВМ19	БВМ25	БВМ31	СОД
Количество животных с положительными результатами, гол. (%)	96 (63,5)	92 (60,9)	64 (42,4)	93 (61,6)	6 (4,0)
Титры антител против рекомбинантных белков	-	1:280 (+4,2; –4,0)	1:250 (+5,0; –4,8)	1:210 (+3,5; –3,3)	1:130 (+4,2; –4,0)

ванного агглютиногенным штаммом бруцелл, антитела выявлялись в РБП, нИФА/БВМ31 и нИФА/БВМ19 через 10 месяцев после вакцинации. В сыворотках крови 42 (27,8%) голов не были обнаружены антитела, специфичные хотя бы к одному из 4 рекомбинантных белков. У некоторых животных антитела связывались с одним из белков, но не «узнавали» другие. Иными словами, использование отдельно взятого белка снижало чувствительность иммуноанализа. Приведенные выше данные недвусмысленно свидетельствуют о том, вакцинированный крупный рогатый скот вырабатывает антитела к белковым антигенам бруцелл. Этот факт не согласуется с результатами I. Ahmed et al., которые на мышинной модели сделали заключение о том,

что нИФА на основе БВМ способен обнаружить постинфекционные антитела против *B. melitensis* 0331, но не выявляет вакцинальные (*B. melitensis* Rev1) [6]. Это противоречие объясняется, по всей вероятности, тем, что иммунный ответ организма на антигены бруцелл может иметь видовые различия. Тем не менее обращает на себя внимание низкая антигенность периплазматического белка СОД для вакцинированных коров: антитела к нему были детектированы лишь у 4% иммунных животных.

Результаты корреляционного анализа между результатами серологических реакций показаны в табл. 2.

Прямая сильная связь с коэффициентом корреляции 0,70 по шкале Чеддока уста-

Таблица 2

Корреляционная связь (r) между показаниями РБП и нИФА
Correlation (r) between BPP and indirect ELISA readings

Серологические тесты	РБП	нИФА/БВМ19	нИФА/БВМ25	нИФА/БВМ31	нИФА/СОД
РБП	1,00	0,01	0,10	0,08	0,09
нИФА/БВМ19	0,01	1,00	0,38	0,70	0,17
нИФА/БВМ25	0,10	0,38	1,00	0,35	0,24
нИФА/БВМ31	0,08	0,70	0,35	1,00	0,16
нИФА/СОД	0,09	0,17	0,24	0,16	1,00

новлена между результатами нИФА/БВМ19 и нИФА/БВМ31. Умеренная зависимость наблюдается между показаниями нИФА/БВМ19 – нИФА/БВМ25 (0,38) и нИФА/БВМ31 – нИФА/БВМ25 (0,35).

Результаты серологических исследований 6-месячных телят-сосунов под иммунными коровами-кормилицами (табл. 3) свидетельствуют о том, что в крови телят обнаруживались антитела ко всем использованным рекомбинантным белкам бруцелл в нИФА, хотя ни в одном случае не получена положительная РБП.

Активность антител молодняка в нИФА на фоне отсутствия сывороточных агглютининов говорит о том, что телята через молоко иммунизировались клетками вакцинного штамма *B. abortus* 19 и/или его дериватами, а именно белковыми компонентами. Образование иммунной системой телят антител против белков клеточной стенки бруцелл можно объяснить большей иммуногенностью их по сравнению с антигенами полисахаридной природы. Антибелковые антитела не в состоянии вызывать агглютинацию клеток в РБП, поскольку БВМ экранируются ЛПС, а СОД локализуется в периплазматическом простран-

Таблица 3

Результаты серологических исследований подсосных телят на противобруцеллезные антитела (n=102)
The results of serological studies of suckling calves for anti-brucellosis antibodies (n = 102)

Показатель	РБП	нИФА на основе рекомбинантных белков <i>Brucella</i> spp.			
		БВМ19	БВМ25	БВМ31	СОД
Количество животных с положительными результатами, гол. (%)	0	32 (31,4)	29 (28,4)	28 (27,5)	17 (16,6)
Титры антител против рекомбинантных белков	-	1:170 (+3,5; -3,3)	1:130 (+2,8; -2,7)	1:170 (+3,5; -3,3)	1:110 (+2,1; -2,1)

стве. Не исключается, что эти антитела могут быть и неполными, т.е. моновалентными. Такие результаты являются доказательством того, что *B. abortus* 19 элиминируется из организма животного более длительное время, нежели считалось ранее, и антигены бруцелл, попадая с молоком в организм телят, вызывают развитие иммунного ответа.

Длительная выживаемость вакцинных штаммов бруцелл в организме животных доказана с помощью современных методов молекулярной биологии. Так, например, аттенуированные штаммы, в том числе *B. abortus* 19, могут выделяться с молоком вакциниро-

ванных коров [11]. Персистенция бруцелл в организме связана, в первую очередь, с неспособностью макрофагов и дендритных клеток лизировать возбудителя внутри фагосом, что приводит к образованию бруцеллосодержащих вакуолей и, следовательно, к их репликации внутри клеток хозяина [12]. Более того, бруцеллы могут не только обойти иммунные факторы хозяина, но и приспособиться к внутриклеточной выживаемости как в фагоцитарных, так и в нефагоцитарных клетках [13].

Таким образом, можно допустить, что в организм подсосных телят с молоком вак-

цинированных коров могут поступать антигенные компоненты шт. *B. abortus* 19, которые стимулируют иммунную систему на синтез специфических антител. Антитела ко всем рекомбинантным белкам были обнаружены нами в нИФА у 5 (4,9%) телят, тогда как ни один из использованных белков не обладал антигенностью по отношению к антителам сывороток крови 38 (37,3%) голов. Наиболее антигенными белками оказались БВМ19 и БВМ31, против которых антитела в титрах от 1:400 до 1:800 обнаруживались у 17,6 и 9,8% телят соответственно. В указанных разведениях сывороток крови положительная реакция на БВМ25 и СОД отмечалась только у 3,9 и 0,9% голов соответственно. Необходимо отметить относительно большую долю телят, нежели коров, реагирующих на СОД-антиген (16,6 против 4%), что можно объяснить возможностью приема одной коровой нескольких телят-сосунов.

Как и при серологических исследованиях коров, тестирование телят в нИФА на основе отдельно взятого белка бруцелл снижало чувствительность анализа из-за пропуска антител, специфичных к другим белкам. Эти данные дают основание предполагать, что антиген, состоящий из комбинации нескольких рекомбинантных белков *Brucella*, позволит иммуноанализу полнее выявлять противобруцеллезные антитела.

Изучение корреляционной связи между результатами различных вариантов иммуноанализа сывороток крови телят показало, что имеется умеренная положительная связь между показаниями нИФА/БВМ25 – нИФА/БВМ31 (0,45); нИФА/СОД – нИФА/БВМ31 (0,45); нИФА/СОД – нИФА/БВМ25 (0,32)

и нИФА/БВМ19 – нИФА/БВМ25 (0,32). Следует отметить, что между двумя последними вариантами нИФА была установлена зависимость и при анализе сывороток крови коров-матерей ($r = 0,38$). Таким образом, почти одна треть поголовья телят-сосунов к 6-му месяцу жизни имела специфические антитела к белкам бруцелл. Эти антитела могут создавать иммунитет у молодняка против бруцеллеза, поскольку доказаны протективные свойства антител, специфичных к БВМ19, БВМ25, БВМ31 и СОД бруцелл [14].

В этой связи изменение, внесенное в ветеринарные (ветеринарно-санитарные) правила (приказ МСХ РК № 206 от 23.05.2019), предусматривающее диагностическое исследование на бруцеллез крупного рогатого скота благополучных пунктов начиная с 12-месячного возраста, имеет под собой научную основу, особенно в случае применения его в мясном скотоводстве. К этому сроку уровень специфических антител у молодняка, выращенного на подсосе под вакцинированными (ревакцинированными) коровами, по всей вероятности, будет незначительным из-за давности отъема от матерей и, следовательно, прекращения антигенного стимула.

Антигенность (реактивность) рекомбинантных белков была весьма высокой к антителам серопозитивных коров из новых эпизоотических очагов (табл. 4).

Агглютинирующие антитела в РБП были обнаружены у всего поголовья. Показания этой пробы полностью подтвердились результатами нИФА/БВМ19 и нИФА/БВМ25, и лишь 3,3–5,3% животных, серопозитивных по РБП, не имели антител, специфичных к БВМ31 и СОД.

Таблица 4

Результаты серологических исследований коров из неблагополучных по бруцеллезу ферм (n=152)
The results of serological studies of cows from dysfunctional brucellosis farms (n = 152)

Показатель	РБП	нИФА на основе рекомбинантных белков <i>Brucella</i> spp.			
		БВМ19	БВМ25	БВМ31	СОД
Количество животных с положительными результатами, гол. (%)	152 (100)	152 (100)	152 (100)	146 (96,7)	146 (96,7)
Титры антител против рекомбинантных белков	-	1:280 (+2,1; –2,1)	1:370 (+2,1; –2,1)	1:350 (+2,8; –2,7)	1:250 (+2,1; –2,1)

Сравнивая результаты нИФА коров из благополучного и неблагополучного пунктов, можно заметить различный характер гуморального ответа животных на использованные белки бруцелл. Так, если антитела против БВМ у поголовья благополучной фермы, трижды ревакцинированного шт. *B. abortus* 19, обнаруживались через 10 месяцев со дня последней иммунизации в 42–62% случаев, то у серопозитивных коров из эпизоотических очагов специфические антитела детектировались в 97–100% случаев, причем, средние титры антител у крупного рогатого скота благополучной фермы против БВМ25, БВМ31 и СОД (1:250, 1:210 и 1:130 соответственно) были достоверно ниже, чем у животных из новых эпизоотических очагов (1:370, 1:350 и 1:250 соответственно; $P < 0,05$). Более того, использование СОД позволило выявить специфические антитела у 96,7% коров этой группы, тогда как среди ревакцинированных животных из благополучной фермы всего 4% поголовья показали положительный результат в нИФА/СОД. В нашей предыдущей работе СОД бруцелл не был реактивен в сыворотке крови скота благополучной фермы, а антитела к данному белку детектировались лишь у 14% коров из неблагополучного пункта [15]. Эти различия, видимо, связаны с периодами развития инфекционного процесса. Неоспоримым является то, что инфицированные и вакцинированные против бруцеллеза

коровы существенно отличаются по характеру антителообразования к СОД.

ВЫВОДЫ

1. Коровы казахской белоголовой породы спустя 10 месяцев после ревакцинации шт. *B. abortus* 19 (время наблюдения) в 60% случаев дают положительные реакции по РБП и нИФА на основе БВМ19 и/или БВМ31, тогда как антитела в нИФА/СОД определяются лишь у 4% поголовья.

2. Около одной трети телят (27,5–31,4%), содержащихся на полном подсосе вместе с ревакцинированными против бруцеллеза матерями, к 6-му месяцу жизни имеют специфические антитела к БВМ бруцелл.

3. Использование в нИФА отдельно взятых рекомбинантных белков бруцелл снижает чувствительность теста при серологических исследованиях крупного рогатого скота благополучного хозяйства.

4. В сыворотках крови серопозитивных коров из эпизоотического очага бруцеллеза антитела к БВМ, а также периплазматическому белку СОД детектируются в 96,7–100% случаев.

5. Диагностическая ценность СОД *Brucella* spp. в дифференциации инфекционных антител от вакцинальных может быть окончательно определена путем постановки эксперимента на крупном рогатом скоте.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *The new global map of human brucellosis* / G. Pappas, P. Papadimitriou, N. Akritidis [et al.] // *Lancet Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 6, N 2. – P. 91–99.
2. *Обзор эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2017 г. и прогноз на 2018 г.* / Д. Г. Пономаренко, Д. В. Русанова, Т. В. Бердникова [и др.] // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2018. – Ч. 2. – С. 23–29.
3. *Crossreactivity in serological tests for brucellosis: a comparison of immune response of Escherichia coli O157: H7 and Yersinia enterocolitica O:9 vs Brucella spp.* / B. Bonfini, G. Chiarenza, V. Paci [et al.] // *Veterinaria Italiana*. – 2018. – Vol. 54, N 2. – P. 107–114.
4. *Brucella melitensis* VirB12 recombinant protein is a potential marker for serodiagnosis of human brucellosis / S. Mirkalantari, A. Zarnani, M. Nazari [et al.] // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* – 2017. – Vol. 16, N 8. – <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0182-4>.

5. *Recombinant* proteins as antigens in serological diagnosis of brucellosis / M. Navarro-Soto, A. Morales-Loredo, G. Álvarez-Ojeda [et al.] // Updates on Brucellosis / M.M. Baddour (ed.). Intech. Open, Croatia, 2015. – P. 161–169.
6. *Serological* diagnostic potential of 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 Veterinary Research. –2015. – Vol. 11. – P. 275.
7. *Immunogenicity* and antigenicity of *Brucella* recombinant outer membrane proteins / A. Bulashev, T. Jakubowski, K. Tursunov [et al.] // Veterinarija Zootechnika. – 2018. – Vol.76, N 98. – P.17–24.
8. Получение штамма продуцента рекомбинантного БВМ19 *Brucella abortus* и изучение его антигенности / А.К. Булашев, К.Т. Турсунов, Ж.К. Каирова [и др.] // Вестн. КазАТУ им. С. Сейфуллина. – 2018. – Вып. 3, № 98. – С. 117–127.
9. *Expression*, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella species* / Y. Manat, A. Shustov, E. Evtehova [et al.] // Open Veterinary Journal. – 2016. – Vol.6, N 2. – P. 71–77.
10. Сайдулдин Т.С. Статистическая обработка результатов серологических реакций // Ветеринария. – 1981. – № 7. – С. 62–66.
11. *Screening Brucella* spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey / F. Kaynak-Onurdag, S. Okten, B. Sen // Journal of Dairy Science. – 2016. – Vol. 99, N 5. – P. 3351–3357.
12. *An evolutionary* strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen / A. Martirosyan, E. Moreno, J.P. Gorvel // Immunol. Rev. – 2011. – Vol. 240. – P. 211–234.
13. *Pathogenesis* and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions / P. de Figueiredo, T.A. Ficht, A. Rice-Ficht [et al.] // Am. J. Pathol. – 2015. – Vol.185. – P. 1505–1517.
14. *Lalsiamthara J., Lee J. H.* Development and trial of vaccines against *Brucella* // Vet. Sci. – 2017. – Vol.18, N 1. – P. 281–290.
15. Изучение антигенности белков бруцелл в иммуноферментном анализе / А.К. Булашев, О.С. Акибеков, А.С. Сыздыкова [и др.] // Вестн. НГАУ. – 2019. – № 1 (50). – С. 92–100.

REFERENCES

1. Pappas G., Papadimitriou P, Akritidis N. The new global map of human brucellosis, *Lancet Infectious Diseases*, 2006, No 2 (6), pp.91–99.
2. Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Berdnikova T.V., Khachaturova A.A., Manin E.A., Kulichenko A.N. *Problemy osobo opasnykh infektsii*, 2018, Ch. 2, pp. 23–29. (In Russ.)
3. Bonfini B., Chiarenza G., Paci V., Sacchini F. Crossreactivity in serological tests for brucellosis: a comparison of immune response of *Escherichia coli* O157: H7 and *Yersinia enterocolitica* O:9 vs *Brucella* spp, *Veterinaria Italiana*, 2018, No 2 (54), pp.107–114.
4. Mirkalantari S., Zarnani A., Nazari M. *Brucella melitensis* VirB12 recombinant protein is a potential marker for serodiagnosis of human brucellosis, *Ann Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2017, No 8 (16), available at: <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0182-4>
5. Navarro-Soto M., Morales-Loredo A., Álvarez-Ojeda G. Recombinant proteins as antigens in serological diagnosis of brucellosis Baddour M.M. (editor) Updates on Brucellosis, Rijeka, Croatia, Intech Open, 2015, pp. 161–169.
6. Ahmed I., Khairani-Bejo S., Hassan L. Serological diagnostic potential of outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay, *BMC Veterinary Research*, 2015, I. 11, 275 p.
7. Bulashev A., Jakubowski T., Tursunov K. Immunogenicity and antigenicity of *Brucella* recombinant outer membrane proteins, *Veterinarija Zootechnika*, 2018, No 98 (76), pp.17–24.

8. Bulashev A. K., Tursunov K. T., Kairova Zh. K., Syzdykova A., *Vestnik KazATU im. S. Seifullina*, 2018, No 8 (3), pp. 117–127. (In Russ.)
9. Manat Y., Shustov A., Evtekhova E. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species, *Open Veterinary Journal*, 2016, No 2 (6), pp. 71–77.
10. Saidul'din T. S. *Veterinariya*, 1981, No 7, pp. 62–66. (In Russ.)
11. Kaynak-Onurdag F., Okten S., Sen B. Screening *Brucella* spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey, *Journal of Dairy Science*, 2016, No. 5 (99), pp. 3351–3357.
12. Martirosyan A., Moreno E., Gorvel J. P. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen, *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 240, pp. 211–234.
13. P. de Figueiredo, Ficht T. A., Rice-Ficht A., Rossetti C. A., et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis *Brucella*-host interactions, *Am. J. Pathol.*, 2015, Vol. 185, pp. 1505–1517.
14. Lalsiamthara J., Lee J. H. Development and trial of vaccines against *Brucella*, *Vet Sci.*, 2017, No. S1 (18), pp. 281–290.
15. Bulashev A. K., Akibekov O. S., Syzdykova A. S., Suranshiev Zh. A., Tursunov K. A., Eskendirova S. Z., *Vestnik nauki Novosibirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2019, No 1 (50), pp. 92–100.