

«Сейфуллин окулары–12: Ғылым жолындағы жастар - болашақтың инновациялық әлеуеті" атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения–12: Молодежь в науке-инновационный потенциал будущего». – 2016. – Т.І, ч.1. – С. 272-275

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЛКОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ *BRUCELLA* В СЕРОДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА

*А.Х. Жумалин, А.К. Булашев,  
Ж.А. Сураншиев, К.А. Турсунов*

Эффективность борьбы с бруцеллезом зависит от своевременной диагностики и изоляции больных животных. В нашей стране и за рубежом в серологической диагностике бруцеллеза используются такие тесты, как РА, РБП, РСК, КР, РИФ и др. В последнее время в диагностической практике находит свое применение ИФА тест-системы. Однако специфичность ИФА в полной мере зависит от природы используемого антигена возбудителя. В коммерческих ИФА-наборах для серологической диагностики бруцеллеза в качестве антигена, как правило, используются ЛПС [1]. Общеизвестно, что именно эти компоненты клетки обуславливают перекрестные реакции между бруцеллами и многими грамотрицательными бактериями [2,3]. Тем не менее, производители диагностикумов отдают предпочтение полисахаридным компонентам из-за легкости их получения. Неслучайно, с внедрением ИФА в практику диагностики Казахстана количество животных, положительно реагирующих на бруцеллез, резко возросло, однако улучшение эпизоотической ситуации не наступало. Учитывая сложившуюся ситуацию, МСХ РК было принято решение вновь использовать классические реакции для серологической диагностики бруцеллеза и возобновить вакцинацию животных. ИФА, как высокочувствительный тест, рекомендован для исследования невакцинированного молодняка. Однако, и в данном случае, использование в ИФА менее специфичного для возбудителя бруцеллеза антигена также может привести к неоправданному убою молодняка крупного рогатого скота из-за естественного контакта животных с микроорганизмами, имеющими сходные детерминанты с бруцеллами в составе ЛПС. В этой связи, поиск более специфичных для бруцелл антигенов и разработка новой тест-системы ИФА остается весьма важной проблемой ветеринарной науки и практики Казахстана. Большой интерес представляют белковые антигены бруцелл, которые определяют не только родовую, но и видовую специфичность бруцелл [4-6].

Целью настоящей работы явилось изоляция белков внешней мембраны (БВМ) *Brucella abortus* и *Brucella melitensis* и изучение возможности использования их в ИФА для определения противобруцеллезных антител.

Двухсуточную культуру обоих штаммов смывали 0,5% карболизированным физиологическим раствором и освобождали от возможных примесей питательной среды путем фильтрации через 3-слойный

марлевый фильтр с ватой. Для инактивации бруцелл флаконы выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 48 часов. Затем взвесь микроорганизмов трижды отмывали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 мин. Нарботанная бактериальная масса была использована для выделения БВМ из клеточной стенки бруцелл.

Получение БВМ бруцелл осуществляли по методике, описанной К.Т. Шенжановым и соавт. (2002) [7], которая основана на элюировании БВМ из клеток бруцелл 0,1М раствором цитрата натрия, содержащий 1М хлорида натрия и 0,1% тритон X-100. Рекомбинантный белок *rBP26* и ЛПС *B.abortus*, были любезно предоставлены ведущим научным сотрудником лаборатории клеточной технологии Национального центра биотехнологии Комитета науки МОН РК, к.в.н. С.З. Ескендириевой. В качестве единого бруцеллезного антигена (ЕБА) использовали биофабричный препарат производства НПП «Антиген», Казахстан.

Образцы сывороток крови крупного рогатого скота, положительно реагирующих на бруцеллез по результатам РА и РСК, сыворотки крови коров, привитых вакциной из штамма *B.abortus* RB-51, а также сыворотка крови коровы, показавшей положительные результаты на бруцеллез по серологическим тестам и ПЦР, были получены от РГП «Республиканская ветеринарная лаборатория».

Электрофорез проводили в 10 %-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) по общеизвестной методике на аппарате для вертикального электрофореза (Bio-Rad, США). Молекулярную массу БВМ определяли с помощью программного обеспечения Photo-Capt Version 12.4 компании "VILBER LOURMAT". Электрофоретический перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану и проявление специфических белковых полос с помощью сывороток крови коров, положительно реагирующих на бруцеллез осуществляли по общепринятой методике.

Антигенность БВМ бруцелл определяли в ИФА с использованием сывороток крови коров, положительно реагирующих на бруцеллез по результатам классических серологических реакций (РА, РБП и РСК) и иммунизированных вакциной из штамма *B.abortus* BR51 по общепринятой методике. Результаты серологических исследований подвергались статистической обработке для определения достоверности различий между титрами антител сывороток крови [8].

Анализ электрофореграммы БВМ *B. melitensis* Rev-1 показал наличие 17 белковых полос с молекулярной массой (мол.м.) от 16,5 кД до 101,1кД, среди которых мажорными оказались пять фракций с мол.м: 58,2 кД; 55,7 кД; 44,3 кД; 40,1 кД, и 31,5 кД. В составе БВМ *B.abortus* 19 обнаружены 11 белков мол.м. которых находились в пределах от 18,8 кД до 101,1кД. Пять мажорных полос имели мол.м: 56,7 кД; 38,4 кД, 31,5 кД; 22,5 кД и 18,8 кД. Среди мажорных белков наиболее представительными у обоих видов бруцелл являются полосы мол.м. которых лежат в диапазоне от 55,7- 58,2кД. Кроме того, у БВМ *B.abortus* 19 белок с мол.м. 18,8 кД образовал одну ярко

выраженную полосу, тогда как в районе этого белка у *Brucella melitensis Rev-1* выявлены три минорные фракции с мол.м.: 19,1 кД; 18,1 кД и 16,5 кД.

Антигенность выделенных препаратов БВМ *B.abortus* и *B.melitensis* была испытана в непрямом ИФА на образцах сывороток крови 49 коров, положительно реагирующих на бруцеллез по РА и РСК. Сывороточные антитела всех серопозитивных животных более активно связывались с БВМ *Brucella*, нежели с его ЛПС, что свидетельствует о сравнительно высокой антигенности приготовленных белковых препаратов. Так, в сыворотке крови серопозитивных животных средний титр антител против ЛПС находился в пределах 1:610 (+26,6%; -21,1%), тогда как антитела, связывающиеся с БВМ *B.abortus 19* и *B.melitensis Rev-1*, обнаруживались до разведения сыворотки крови 1:2 110 ( $t=4,76$ ;  $P<0,001$ ) и 1:4220 ( $t=6,67$ ;  $P<0,001$ ), соответственно.

Существенные различия установлены и между титрами антител против БВМ и антигена *rBP26*. Например, антитела серопозитивных животных наиболее активно связывались с БВМ *B.abortus 19* ( $t=6,19$ ;  $P<0,001$ ) и *B.melitensis Rev-1* ( $t=7,5$ ;  $P<0,001$ ), нежели с рекомбинантным антигеном. Аналогичные различия были зарегистрированы и по показателям ОП лунок, сенсibilизированных упомянутыми антигенами. Следует подчеркнуть, что у 4 гол. или 8,2% поголовья, при использовании *rBP26* получен отрицательный результат в ИФА. Кроме того, рекомбинантный антиген уступал по своей антигенности ЛПС ( $t=3,15$ ;  $P<0,05$ ).

Средняя ОП реакционной жидкости лунок, сенсibilизированных ЛПС, была существенно ниже, чем показатели экстинкции лунок, покрытых БВМ *B.melitensis* ( $P<0,001$ ). Кроме того, белки этого вида бруцелл оказались более антигенными, чем БВМ *B.abortus* ( $P<0,001$ ). По средним показателям ОП реакционной жидкости лунки, покрытые ЛПС и БВМ *B.abortus*, существенно не отличались между собой, хотя положительный результат был более четко выражен при использовании последнего антигена. Например, при тестировании сывороток крови серопозитивных животных в ИФА средняя ОП лунок с ЛПС превышала показатель экстинкции контрольной лунки в 2,73 раза (0,189 и 0,69, соответственно), а в случае использования БВМ *B.abortus 19* это превосходство было более существенным – в 10,1 раза (0,192 и 0,19, соответственно).

Антигенность БВМ *B.abortus 19* и *B.melitensis Rev-1* была изучена и на образцах сыворотки крови, полученных от коров через 14 дней после прививки вакциной из штамма *B.abortus RB-51*. Эта вакцина изготавливается на основе шероховатого R-штамма бруцелл, лишенной O-цепи ЛПС. По инструкции изготовителя она не вызывает образования S-антител, и поэтому при использовании классических серологических тестов позволяет дифференцировать больных от вакцинированных животных (таблица 2).

Антитела против БВМ *B.abortus 19* и *B.melitensis Rev-1* обнаруживались у 14 гол.(56%) и 11 гол.(44%), соответственно. Сравнимые показатели находились между собой в тесной корреляционной связи ( $r=0,80$ ). На

рекомбинантный антиген положительную реакцию показали 9 гол., или 36% поголовья. Между БВМ бруцелл и *rBP26* антигеном была установлена корреляционная связь средней степени ( $r=0,51$ ). Результаты серологических реакций, предназначенные для выявления S-антител (ИФА с ЛПС или ЕБА и РБП), находились между собой в слабой корреляционной связи.

По результатам иммуноблоттинга среди фракций БВМ *B.melitensis Rev-1* антигенностью обладали белки с мол.м 26 кД, 19 кД, 15 кД и 12 кД. Отметим, что последние две полосы не обнаруживались в электрофореграмме. Среди высокомолекулярных фракций антигенное свойство установлено у белка с мол.м.116 кД. Из состава БВМ *B.abortus 19* антигенность по отношению к антителам положительной сыворотки проявили белки с мол.м. 57 кД, 19 кД, 17 кД и 15 кД. Причем, последние две фракций также не окрашивались в электрофореграмме. Следует подчеркнуть, что БВМ *B.abortus 19* кД и 15 кД и *B.melitensis 19* кД, 15 кД и 12 кД детектировались антителами сыворотки крови коровы, показавшей положительные результаты на бруцеллез по серологическим тестам и ПЦР.

Таким образом, нами установлено, что в составе БВМ обоих видов бруцелл имеются как общие, так и индивидуальные белковые фракции. У *B.abortus 19* и *B. melitensis Rev-1* наиболее представительными оказались белки с мол.м. 56,7 кД; 55,7 и 58,2 кД, соответственно. Следует отметить, что белок с мол.м. 31,5 кД был детектирован в электрофореграмме обоих видов бруцелл, хотя в некоторых работах исследователи считают его не свойственным *B.abortus* [9]. Причем, следует отметить, что этот белок не обладал антигенностью. Мажорные белки с мол.м. 22,5 кД и 18,8 кД выявлялись только у *B.abortus*. На наш взгляд, наибольшую перспективность в качестве диагностически важного антигена среди фракций БВМ обоих видов бруцелл имеют белки с мол.м. 18,8-19,1 кД и 15 кД, а также белок *Brucella melitensis* с мол.м 12 кД, которые показали антигенные свойства в иммуноблоттинге при использовании сыворотки крови коровы, показавшей положительную реакцию на бруцеллез как по результатам серологических тестов, так и ПЦР патматериала. Имеется сообщение о возможности использования БВМ *B.abortus* с мол.м.19 кД в ИФА для определения специфических антител в сыворотке крови коров [10]. Таким образом, БВМ представляют собой весьма ценный компонент клеточной стенки в составе которых имеются диагностически важные белки, которые могут быть использованы в качестве специфического антигена в серологических тестах.

## Список литературы

1 Bulashev A.K., Suranshiev Z. Using *Brucella abortus* outer membrane proteins in serodiagnosis of Brucellosis // Abstracts of Eight Annual International Symposium on Agriculture, Third Annual International Conference on Ecology,

Ecosystems and Climate Change & Third Annual International Forum on Water, 13 – 16 July 2015, Athens, Greece. – P. 43-44.

2 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.

3 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.

4 Gupta V.K., Verma D.K., Singh S.V., Vihan V.S. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis. // *Small Ruminant Research*. – 2007. – Vol. 70, № 2–3. – P. 260-266.

5 Lim J.J., Kim D.H., Lee J.J., Kim D.G., Min W., Lee H.J., Rhee M.H., Chang H.H., Kim S. Evaluation of recombinant 28 kDa outer membrane protein of *Brucella abortus* for the clinical diagnosis of bovine brucellosis in Korea // *J. Vet. Med. Sci.* – 2012. – Vol. 74, №6. – P. 687-691.

6 Ko K.Y., Kim J., Her M. et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis // *Vet. Microbiology*. – 2012. – Vol.156, №3 – 4. – P.374-380.

7 Патент №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. – С. 4.

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

9 Cassataro J., Pasquevich K., Bruno L., Wallach J.C., Fossati C.A., Baldi P.C. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae* // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2004. – Vol. 11, №1. –P. 111-114.

10 Simborio H.L., Lee J.J., Bernardo Reyes A.W., Hop H.T., Arayan L.T., Min W., Lee H.J., Yoo H.S., Kim S. Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis. *Microb. Pathog.*, 2015, vol. 83/84, pp. 41-46. doi: 10.1016/j.micpath.2015.05.004.