

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.6. - С.181-183

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ БЕЛКОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ БРУЦЕЛЛ

Андыбаева С.

Проблема заболеваемости бруцеллёзом не сходит с повестки здравоохранения и ветеринарного надзора [1]. Бруцеллез – хронически протекающая инфекционная болезнь многих животных. Экономический ущерб обусловлен недополучением приплода (аборты могут регистрироваться у 60 % животных), заболевание человека бруцеллезом может привести к инвалидности (чаще из-за поражения суставов) и в некоторых случаях даже к смерти.

Одним из главных факторов успеха оздоровительных мероприятий является своевременная диагностика и изоляция больных бруцеллезом животных, однако до настоящего времени ветеринарная практика не располагает высокоэффективными методами и средствами диагностики бруцеллеза. Анализ применяемых методов для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота показывает, что не существует какого-то одного универсального метода диагностики бруцеллеза животных, который бы давал объективную информацию об эпизоотологической ситуации во всех без исключения случаях. В этой связи, определенную перспективу в диагностической практике имеют ИФА тест-системы [2]. Однако специфичность ИФА в полной мере зависит от природы используемого антигена возбудителя. Общеизвестно, что чувствительность, специфичность и воспроизводимость иммуноферментного анализа (ИФА), в первую очередь, определяются свойством антигена или антител, используемых в данном тесте.

Вследствие этого большой интерес представляют белки внешней мембраны (БВМ), которые определяют не только родовую, но и видовую специфичность бруцелл [3, 4].

Целью настоящей работы явилось выделение белков внешней мембраны (БВМ) *Brucella abortus* и *Brucella melitensis* и изучение их иммуногенных свойств.

В результате работы по накоплению бактериальной массы бруцелл была получена взвесь клеток *B. abortus* 19 и *B. melitensis* Rev-1 в количестве 50 мл (влажная масса) с концентрацией 240 млрд. и 300 млрд. микробных клеток в 1 см³ по общепринятой методике [5].

Наработанная бактериальная масса была использована для выделения БВМ из клеточной стенки бруцелл.

Получение БВМ бруцелл осуществляли по методике, описанной К.Т. Шенжановым и соавт. (2002) [6], которая основана на элюировании БВМ из клеток бруцелл 0,1М раствором цитрата натрия, содержащий 1М хлорида натрия и 0,1% тритон X-100. Содержание белка определялось по методу Bradford M. (1978) [7].

Выход БВМ *B. abortus 19*, *B. melitensis Rev-1* представлен в таблице 1.

Таблица 1. Результаты проверки концентрации БВМ бруцелл

№	Антиген	Вес бак. массы (г)	Объем (мл)	Концентрация
1	<i>B.abortus 19</i>	1,50 г	3 мл	1000 мкг/мл
2	<i>B.melitensis Rev-1</i>	0,52 г	1 мл	500 мкг/мл

Как видно из таблицы, вес бактериальной массы составил у *B. abortus 19*- 1,50 г. и *B. melitensis Rev-1*- 0,52 г., объем 3 мл и 1 мл, соответственно.

В результате определения концентрации белка, установлено, что *B. abortus 19* имеет наибольшую концентрацию белка равной 1000 мкг/мл, тогда как концентрация *B.melitensis Rev-1* равна 500 мкг/мл.

Следующим этапом работы явилось определение иммуногенности полученных антигенов бруцелл и получение иммунных сывороток. Для этого были использованы антигены БВМ *B.abortus 19* (1000 мкг/мл) в качестве природного антигена и рекомбинантные антигены бруцелл *Omp 25* (500 мкг/мл), *Omp Vm-Va* (1000 мкг/мл).

С целью получения антисывороток против БВМ *B.abortus 19*, *Omp 25*, *Omp Vm-Va* была отработана оптимальная схема иммунизации кроликов, обеспечивающая максимальную концентрацию специфических антител.

Для определения иммуногенных свойств антигенов использовали схему 42-дневной иммунизации, путем введения БВМ *B.abortus 19*, *Omp 25*, *Omp Vm-Va* в 1-й день – подкожно вдоль хребта, в дозе 1 мл (концентрация 0,5 мг/мл) с полным адьювантом Фрейнда, на 14-й и 28-й – подкожно, в дозе 1 мл (0,5 мг/мл) с неполным адьювантом Фрейнда, на 35-й день – подкожно, в дозе 0,5 мл (0,5 мг/мл) без использования адьюванта Фрейнда. Отбор крови и тестирование проводили на 38-й день иммунизации с использованием непрямого метода ИФА. Тотальный забор крови проводили на 42-й день.

Использованная схема иммунизации позволила нам получить антисыворотки против упомянутых антигенов с титрами 1:6400, 1:12800, 1:12800, соответственно.

Полученные образцы антисывороток подвергали последовательной очистке методами сульфат-аммонийного высаливания с последующим диализом и гель-фильтрационной хроматографии по общеизвестным методикам.

Для очистки *IgG* использовали коммерческий набор MabTrapKit (Швеция). Данный метод позволил получить очищенную *IgG*-фракцию антител против использованных антигенов.

Молекулярную массу очищенной фракции *IgG* определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) по общеизвестной методике на аппарате для вертикального электрофореза (Bio-Rad, США). Анализ электрофореграммы показал наличие двух мажорных полос с молекулярной массой 25,0 кДа и 55,0 кДа, соответствующие его тяжелым и легким цепям.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что использованные природные БВМ, а также рекомбинантные белки *Отр 25* и *Отр Вм-Ва* бруцелл вызывают у лабораторных животных хорошо выраженный иммунный ответ в виде антителообразования, т.е. обладают иммуногенными свойствами. *IgG*-фракции антител, имеющие специфичность к рекомбинантным белкам, будут использованы для приготовления ферментных конъюгатов, которые необходимы для разработки конкурентного ИФА, предназначенного для серологических исследований различных видов животных на бруцеллез.

Список литературы

1. Уразаева С. Т., Нурмухамедова Ш. М., Умарова А. Е. Бруцеллез в Казахстане // Международный научный журнал.-2016.-№1.-С.27-28
2. Подоляко М.П., Баташев В.В., Уралева В.С. Иммуноферментный метод обнаружения бруцеллезных антител и антигена в сыворотке крови животноводов из неблагополучных по бруцеллезу хозяйств // Журн. микробиол.-2001.-№ 6.-С.53-54
3. Абсатиров Г. Г. Состояние и пути совершенствования противобруцеллезных мероприятий // Ветеринария. Алматы, 2015.-№3.-С.32-35
4. Ко К.У., Kim J., Her M. et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Vet. Microbiology*, 2012, vol.156, no. 3-4, pp.374-380
5. Крыканов А.А. Получение антигенов *Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* 19 ВА и оценка перспективности их использования в качестве основы противобруцеллезной вакцины: Диссертация.-Москва, 2010.- 129 с.: ил. РГБ ОД, 61 10-3/982
6. Патент №14230 Республики Казахстан G01N33/535. Метод определения антител против возбудителя бруцеллеза. Шенжанов К.Т., Сураншиев Ж.А., Булашев А.К., Оспанова С.Г. опубл.22.07.2002
7. Bradford M. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, no. 4, pp.248-254