

С. Сейфуллиннің 125 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары – 15: Жастар, ғылым, технологиялар: жаңа идеялар мен перспективалар» атты халықаралық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Международной научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 15: Молодежь, наука, технологии - новые идеи и перспективы», приуроченной к 125 летию С. Сейфуллина. - 2019. - Т.І, Ч.1 - С.86-88

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИСЫВОРОТКИ ПРОТИВ КЛЕТОК *BRUCELLAABORTUS* ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕЕ В ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕННОСТИ БЕЛКОВ ПАТОГЕНА

*А. К Булашев., О. С Акибеков.,
А. С. Сыздыкова, Ә.К. Амантаев*

Бруцеллез является эндемичной инфекцией в Азии, Африке к югу от Сахары, некоторых странах Латинской Америки, Ближнего Востока и Средиземноморья и Юго-Восточной Европы [1]. Болезнь причиняет не только большие экономические потери в животноводстве, но также создает серьезную угрозу для общественного здравоохранения [2,3]. Сложная эпизоотическая и эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу сохраняется и в Республике Казахстан, где болезнь остается эндемичной [4,5].

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. Для сравнения: в России с населением в десять раз больше, чем в Казахстане, зарегистрировано всего 300-400 случаев заболевания бруцеллезом [6].

Эффективность программы борьбы с бруцеллезом и искоренение болезни в первую очередь зависит от своевременного выявления инфицированных животных с помощью серологических тестов. Общеизвестными серологическими тестами для диагностики бруцеллеза КРС в Казахстане являются РА, РСК и РБП. Эти тесты, основанные на использовании S-ЛПС бруцелл в качестве антигена, не всегда дают надежные результаты из-за перекрестной реактивности с другими грамотрицательными бактериями [7-9]. Таким образом, продолжается поиск антигенов-кандидатов, не относящихся к ЛПС, а именно белковых антигенов, пригодных для серологической диагностики бруцеллеза [10-12].

Поэтому весьма трудно дифференцировать животных, иммунизированных живыми аттенуированными вакцинами, от индивидуумов, инфицированных бруцеллезом естественным путем [13]. Более того, традиционные тесты, основанные на использовании в качестве антигена S-ЛПС цельной клетки бруцелл, не всегда дают надежные результаты из-за перекрестной реактивности с другими грамотрицательными бактериями, такими как *Yersiniaenterocolitica* O:9 [5], *Escherichiacoli* O157: H7 [6], *Salmonellaspp.*, *Pseudomonasmaltophilia* и др. [7]. В этой связи, иммуногенные белки бруцелл остаются в центре внимания исследователей,

занимающихся разработкой диагностических наборов и вакцинных препаратов [8].

Целью работы явилось получить гипериммунную сыворотку против цельных клеток *Brucellaabortus* 19 и испытание ее активности в непрямом варианте ИФА по отношению к рекомбинантным белкам бруцелл.

Для получения гипериммунную сыворотку кролики иммунизировались убитыми клетками *Brucellaabortus* 19 по методике, описанной ранее [26].

В кроликов вводили подкожно *Brucellaabortus* 0331 (убитый антиген) 1×10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл ПАФ, затем подкожно вводили вторую дозу вакцины *Brucellaabortus* (убитый антиген) 0.5×10^9 КОЕ/мл НАФ. На 21 и 35 сутки соответственно, и третья доза вакцины проводили на 45 сутки подкожно *Brucellaabortus*(убитый антиген) 0.5×10^9 КОЕ/мл без адьюванта.

Активность антисывороток, полученных от двух кроликов путем иммунизации убитой цельной клеткой *Brucellaabortus*19, была определена в непрямом варианте ИФА, в котором в качестве антигена были использованы ЭБА *Brucellaabortus* (таблица 1).

Таблица 1 – Динамика титра сывороточных антител в процессе иммунизации кроликов убитой цельной клеткой *Brucellaabortus* 19

Порядковые номера животных	Дни иммунизации кроликов			
	14	21	35	45
	Титры антител			
№1	1:800	1:800	1:12 800	1:51 200
№2	1:400	1:400	1:12 800	1:25 600

Из таблицы 1 следует заметить, что в первые три недели титры антител оставались на низком уровне (1:400-1:800). Усиление антителообразования отмечалось на 35-ый день иммунизации. К этому сроку животные были иммунизированы цельными клетками *Brucellaabortus* 19 дважды. После третьей инъекции иммуногена (35-ый день) к концу иммунизации (45-ый день) титры гипериммунных сывороток достигали 1: 25 600 – 1: 51 200.

Антисыворотка кролика №1, полученная противцельной клеткой *Brucellaabortus* 19, была использована для определения антигенности рекомбинантных белков бруцелл с помощью непрямого варианта ИФА (таблица 2)

Таблица 2 - Антигенность рекомбинантных белков по отношению к кроличьей гипериммунной сыворотке в непрямом варианте ИФА

Дни п.и.	№ животного	Титры антител сывороток крови кроликов против белковых антигенов				
		SOD	Vp 26	Omp31	Omp 25	Omp 19

14	1	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:3 200	1:6 400
	2	1:3 200	1:6400	1:1600	1:1600	1:1600
21	1	1:6 400	1:6 400	1:3 200	1:3 200	1:1 600
	2	1:1600	1:3200	1:6400	1:6400	1:6 400
35	1	1:6 400	1:3 200	1:3 200	1:6 400	1:800
	2	1:1600	1:6400	1:800	1:1600	1:3200
45	1	1:6 400	1:3 200	1:3 200	1:6 400	1:3 200
	2	1:6 400	1:3 200	1:3 200	1:6 400	1:3 200
Примечание: п.и. – после иммунизации						

Сравнивая данные таблицы 1 и 2 можно заметить, что антителиобразование на рекомбинантные белки происходит более интенсивно, чем на антигены цельной клетки *Brucella abortus* 19. Например, если активизация антителиобразования против цельно-клеточного антигена была отмечена только на 35-ый день иммунизации, то титры антител против рекомбинантных белков бруцелл, обнаруженные на 14-ый день после иммунизации, существенно не отличались от таковых в конце опыта. Эти данные свидетельствуют, во-первых, о выраженных антигенных свойствах приготовленных нами рекомбинантных белков, а во-вторых, являются доказательством того, что они экспрессированы прокариотными продуцентами в активном состоянии.

Достигнутые результаты позволяют заключить, что трехкратная инъекция убитых цельных клеток *Brucella abortus* 19 кроликов (21 и 35 день) позволяет получить к концу иммунизации (45 день) антисыворотку с титром антител против ЭБА бруцелл в пределах 1:25 600 – 1:51 200. Рекомбинантные белки распознавались кроличьей гипериммунной антисывороткой, что является доказательством того, что они экспрессированы *E.coli* в активном состоянии. Антитела гипериммунной кроличьей антисыворотки взаимодействовали с рекомбинантными белками BP 26, Omp32 и Omp19 до разведения 1:3200, тогда как титр антител против SOD и Omp25 достигал до 1:6400.

Приготовленная гипериммунная кроличья сыворотка, так же может быть использована для оценки активности (антигенности) рекомбинантных белков бактерий рода *Brucella*.

Список литературы

1. Nicoletti P. Brucellosis: past, present and future // Contributions, Sec. Biol. Med. Sci., MASA. – 2010. – Vol. 31, № 1. – P. 21–32.
2. Corbel M.J., Elberg S.S., Cosivi O. Brucellosis in humans and animals. Geneva: WorldHealthOrganization. – 2006. – P.13-21.
3. Akpinar O. Historical perspective of brucellosis: a microbiological and epidemiological overview // Infez Med. – 2016.-Vol. 24(1).- P.77-86.

4. Қисықов Т. Сиырбруцеллезінің Қазақстандағы индеттік жағдайы // Ветеринария (Қаз.). – 2009. – №3(7). – С.44-46.
5. Shevtsova E., Shevtsov A., Mukanov K. et al. Epidemiology of Brucellosis and Genetic Diversity of *Brucella abortus* in Kazakhstan // PLoS One. 2016 Dec 1;11(12):e0167496. doi: 10.1371/journal.pone.0167496. eCollection 2016.
6. Иванов Н.И. Бруцеллез // Ж. AgroӘlem. – 2010. – №2(7). – С.40-47.
7. Corbel M.J. Recent advances in the study of *Brucella* antigens and serological cross-reactions // Vet. Bull. – 1985. – Vol.55. – P.927-942.
8. Baldi PC, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, et al. 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 // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 1996. – Vol. 3. – P.472-476.
9. Velasco J., Romero C., López-Goñi I., et al. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. International journal of systematic bacteriology. – 1998. – Vol.48. – P.759-768.
10. Contreras-Rodriguez A., Seleem M.N., Schurig G.G., et al. Cloning, expression and characterization of immunogenic aminopeptidase N from *Brucella melitensis* // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 2006. – Vol.48. – P.252-256.
11. Connolly J.P., Comerci D., Alefantis T.G., et al. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development // Proteomics. – 2006. – Vol.6(13). – P.3767-3780.
12. Ko K.Y. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reaction in brucellosis diagnosis // Veterinary Microbiology. – 2012. – Vol.156, №3-4. – P.374-380.
13. Mandal SS, Duncombe L, Ganesh NV, Sarkar S, Howells L et al. Novel solutions for vaccines and diagnostics to combat brucellosis. ACS Central Science 2017; 3(3):224–231. doi: 10.1021/acscentsci.7b00019
14. [Ahmed I.M., Khairani-Bejo S., Hassan L., et al. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay // BMC Vet. Res.–2015. – Vol.11. – P.275. doi: 10.1186/s12917-015-0587-2]