

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.1, Ч.1 - Б.108-110

БРУЦЕЛЛАНЫҢ СЫРТҚЫ МЕМБРАНА ПРОТЕИНДЕРІН АЛУ

Шакимова Л., Сураншиев Ж. А.,
Сыздыкова А. С.

Бруцеллез – (*Brucellensis*) - жануарлар мен адамның созылмалы жұқпалы ауруы. Көптеген жануарларда іш тастау, өмір сүруге қабілетсіз төлдердің туылуы және бедеулікпен көрінеді. Бруцеллез қоздырғышы – *Brucella* spp. жасуша ішілік, грам-теріс бактерия [1,2].

Әлеуметтік қауіптілігіне байланысты бруцеллез карантиндік аурулар тізіміне енгізілген. Бруцеллезбен күресу тиімділігі ауру жануарларды дер кезінде анықтауға және оқшаулауға байланысты. Біздің елімізде және шетелде бруцеллездің серологиялық диагностикасында АР, РБС, КБР, СР, ИФР және т.б. тесттер қолданылады. Соның ішінде соңғы кездері жиі қолданылатыны иммунды ферменттік талдау (ИФТ), ИФТ ерекшелігі қолданылатын антиген қоздырғышының табиғатына толық байланысты. ИФТ сезімталдығы, телімділігі және өнімділігі, бірінші кезекте, осы тестте пайдаланылатын антиген немесе антиденелердің қасиетімен анықталатыны жалпыға мәлім. Осыған орай аса көп қызығушылықты сыртқы мембрана протеиндері (СМП) тудыруда, ол тек бруцелланың туыстығын ғана емес, сонымен қатар түрлік телімділігін де анықтайды [3,4]. Олардың арасында ең көп таралған танымалдылығы жоғары сезімталдықпен және оны қою кезеңдерін автоматтандыру мүмкіндігімен түсіндіріледі. Бруцеллез әлемнің көптеген елдерінде – Африка, Орталық және Оңтүстік Америка, Азия мен Еуропаның кейбір елдерінде, соның ішінде ТМД елдерінде (Украина, Ресей, Қазақстан) таралған.

Малдардың бруцеллезге шалдығуы Ақмола, Қарағанды және Батыс Қазақстан облыстарында (2,45-2,77%) аса жоғары көрсеткішке ие, ал Атырау, Қостанай және Павлодар облыстарында малдардың шалдығуы республика бойынша орташа көрсеткішке жақын (1,05-1,13%) [5].

Бруцелланың СМП алу К. Т. Шенжанов және басқалары сипаттаған әдістеме бойынша жүзеге асырылды [6], құрамында 1 М натрий хлориді және 0,1% X-100 тритоны бар 0,1 М натрий цитраты ерітіндісімен бруцелла жасушаларынан СМП элюациялауға негізделген. Протеин мөлшері Bradford M. (1978) әдісі бойынша анықталды [7].

Brucella abortus – жасуша ішілік бактерия, оладамдар мен жануарлардың антидене мен комплемент компоненттеріне қол жетімсіз макрофагында орналасқан.

Жұмыстың басты мақсаты бруцелланың сыртқы мембрана протеиндерін алу болып табылады.

Екі тәуліктік *Br.abortus*-54 штамының жасуша суспензиясы физиологиялық ерітіндімен бірнеше рет шайылып, центрифуга көмегімен 30 минут бойы 5000 айн/мин. жағдайында тұндырылды. Сосын 6,07 г жасуша тұнбасына құрамында 1,0М NaCl және 0,1% X-100 тритоны бар 0,1М цитрат натрий ерітіндісінің (рН 7,4) 12 мл-і қосылып, 16–18 сағат бойы 37°C температурада магнитті араластырғышпен экстракцияланады. Экстракцияланған жасуша суспензиясы 3000 айн/мин. 20 минут центрифугалағаннан кейін тұнба үсті сұйықтығы алынып, қайта тұндырылды. Екінші рет тұндырылған шөгінді сұйықтығы рН-ы 7,2–7,4 фосфатты тұз ерітіндісіне қарсы 16–18 сағат бойы +4°C температурада диализденді. Алынған антигендік препараттың құрамындағы протеин мөлшері 0,5 мг/мл құрады.

Зерттеу жұмыстарының келесі кезеңінде алынған антигендік препараттың иммуногендік қасиетін анықтау үшін екі апталық иммундеу схемасын қолдандық.

Бірінші күні толық Фрейд адьювантының 0,1 мл-імен, жетінші тәулікте толымсыз Фрейд адьювантымен араластырылған сыртқы мембрана протеиндерінің 0,1 мл-і зертханалық ақ тышқандардың құрсақ қуысына енгізілді. Ал 11, 12, 13 күндері тышқандар фосфатты тұз ерітіндісімен (рН 7,2–7,4) араластырылған 0,1 мг антиген егілді. Соңғы иммундеуден кейін 4 күн өткен соң, яғни 17-і тәулікте зертханалық ақ тышқандардың құйрық көк тамырынан қан алып, оның сарысуы үлгілерінің құрамындағы бруцеллаларға телімді антиденелердің мөлшері ИФТ «жанама» қойылымымен анықталды. Бақылау ретінде иммунделмеген зертханалық ақ тышқандардың қан сарысуы қолданылды.

ИФТ-дың «жанама» қойылымында сыртқы мембрана протеиндері полистиролды планшет шұңқыршалары сенсбилизацияланып, 16–18 сағат бойы +4°C температурада иммобилизацияланды. Одан кейін планшет шұңқыршалары рН-ы 7,2–7,4 болатын, твин-20 қосылған 0,01М фосфатты тұз ерітіндісімен бірнеше рет шайылды. Зерттеуге алынған иммунды қан сарысулары үлгілері мен бақылау ретінде алынған негативті қан сарысуларының үлгілері 1:100 бен 1:3276800 аралығында твин-20 қосылған 0,01М фосфатты тұз ерітіндісімен сұйылтылып, планшеттер 1 сағат бойы 37°C температураға қалдырылды. Инкубация уақыты аяқталғаннан кейін планшеттерді шаю процесі қайталанды. Пайда болған «антиген+антидене» кешенін анықтау мақсатында қатты фаза пероксидазамен таңбаланған тышқандардың иммуноглобулиндеріне қарсы антиденелермен – конъюгатпен өңделді (1 сағат 37°C). Антиген – антидене иммунды кешенімен байланысқа түспеген конъюгаттан арылу үшін планшет шұңқыршықтары твин-20 қосылған 0,01М фосфатты тұз ерітіндісімен бірнеше рет шайылып, олардың әрқайсысына субстрат ерітіндісі құйылды. Планшетті бөлме температурасында, қараңғы жерде 3-5 минут ұстағаннан кейін шұңқыршаларға тең көлемде стоп-реагент қосу арқылы реакция тоқтатылды.

Реакция нәтижелері 492 нм толқын ұзындығындағы спектрофотометр көмегімен анықталды. Оң нәтиже ретінде 1:100 сұйылтылымындағы негативті бақылау қан сарысуының оптикалық тығыздығынан (ОТ) екі есе немесе одан да көп ОТ көрсеткен қан сарысуының сұйылтымдары алынды.

Бруцеллалардың сыртқы мембрана протеиндерімен иммунделген зертханалық ақ тышқандардың қан сарысуларындағы антиденелерінің титрлері 1:3200 – 1:12800 аралығында болғандығы айқындалды. Сонымен, *Brucella abortus* 54 штамының сыртқы мембрана протеиндерін зертханалық ақ тышқандардың құрсақ қуысына еккен жағдайда, жануарлардың иммундық жүйесі аталмыш антигенге қарсы антиденелердің қарқынды түзілуін қамтамасыз ететіндігі анықталды.

Әдебиеттер тізімі

1. Corbel MJ: Brucella. In: Topley WWC, Willson GS, (eds.), Principals of Bacteriology, Virology and Immunity. London: Hodder and Stoughton, pp. 340-51, 1990.
2. Smith LD, Ficht TA: Pathogenesis of brucella. Crit Rev MicrobioI17(3): 209-26, 1990.
3. Абсатиров Г. Г. Состояние и пути совершенствования противобруцеллезных мероприятий // Ветеринария. Алматы, 2015.-№3.- С.32- 35
4. 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. Плотникова Э.М., Салмаков К.М., Иванов А.В. Иммуномониторинг бруцеллеза животных // Ветеринария (РФ). – 2010. – №5. – С.26-30.
6. Патент No14230 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