

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 - С.43-47

ИММУНОГЕННОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ *BRUCELLAABORTUS* 19

*Б. Қ. Іңірбай, А. Қ. Өмірзақова,
А. С. Сыздыкова, А. К. Булашев*

Бруцеллез является одной из наиболее распространенных зоонозных инфекций, которая весьма негативно влияет на продуктивность скота и ведет к пожизненной инвалидности [1]. Эффективность борьбы с бруцеллезом, в первую очередь, зависит от своевременной диагностики и изоляции больных животных. В последнее время в диагностической практике находят свое применение тест-системы, основанные на использовании иммуноферментного анализа (ИФА). Возрастающая популярность ИФА объясняется высокой чувствительностью теста и возможностью автоматизации этапов его постановки [2]. Однако, имеющиеся на рынке бруцеллезные ИФА-тесты, а также классические реакции (РА, РБП и РСК), могут дать ложноположительные результаты, поскольку они выявляют антитела против липополисахаридов (ЛПС) клеточной стенки бруцелл [3]. ЛПС, как известно, являются причиной перекрестных реакций с другими клинически значимыми грамотрицательными бактериями [4]. В этой связи, особую актуальность приобретают исследования, направленные на поиск антигенов, специфичных для возбудителя бруцеллеза. Среди таких антигенов наибольшую перспективность имеют белки внешней мембраны (БВМ) [5].

На современном этапе развития генной инженерии одним из эффективных подходов получения *Brucella*-специфичных антигенов, пригодных для разработки диагностикумов или вакцинных препаратов, является создание штаммов-продуцентов рекомбинантных белков патогена [6]. В последние годы активно ведутся научные исследования по изучению антигенных и протективных свойств БВМ бруцелл, в частности белка с молекулярной массой 19 кДа [7]. Использование рекомбинантного белкового антигена исключает детекцию гетерологичных антител, перекрестно реагирующих с ЛПС бруцелл, и повышает чувствительность серологической диагностики.

Целью нашей работы явилось изучение иммуногенности рекомбинантного БВМ *Brucella abortus* с молекулярной массой 19 кДа (Omp19) в сравнении с природным белковым препаратом - экстрагируемым белковым антигеном (ЭБА) из клеток *B. abortus*.

Материалы и методы

Белковые антигены бруцелл. В работе были использованы рекомбинантный белок Omp19 *B. abortus*, полученный А.К.Булашевым и соавт. (2018) [8]. Приготовление ЭБА *B. abortus*19 проводили по методу L.Tabatabai и D.Deyoe (1984)[9].

Лабораторные животные. Белые беспородные мыши в количестве 30 гол. (самцы 8-10 недельного возраста, с живой массой 20-25 г) содержались в стандартных условиях в соответствии с требованиями «Принципов надлежащей лабораторной практики (GLP)». Все мероприятия с участием животных выполнялись с соблюдением высоких стандартов биобезопасности и обеспечения благополучия животных. На проведение экспериментов с лабораторными животными было получено разрешение этической комиссии АО «Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина».

Иммунизация белковыми препаратами бруцелл. Для этой цели были использованы 10 групп беспородных мышей, по 3 головы в каждой группе. Животные 1, 2 и 3 групп иммунизировались однократно Omp19 бруцелл в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ), неполном адьюванте Фрейнда (НАФ) и/или забуференном физиологическом растворе (ЗФР), соответственно. Мыши 4, 5 и 6 групп иммунизировались ЭБА *B. abortus* по этой же методике. В 7 группе иммунизация Omp19 проводилась двукратно: 0 день в смеси с НАФ и 14 день – ЗФР. Животные 8 группы подвергались иммунизации по этой же схеме, но с использованием ЭБА *B. abortus*. Трехкратная иммунизация по схеме: Omp19 или ЭБА *B. abortus* 19 +ПАФ (0 день), Omp19 или ЭБА *B. abortus* 19 +НАФ (14 день) и Omp19 или ЭБА *B. abortus* 19 +ЗФР (21 день) была использована в 9 или 10 группах животных, соответственно. Количество белка на одну инъекцию составляло 25 мкг на голову. Забор крови из хвостовой вены у животных 1-6 групп брали на 21 день, а у мышей 7-10 групп – на 28 день иммунизации. По окончании иммунизации брали образцы крови из хвостовой вены для определения титра антител в непрямом ИФА (н-ИФА).

Определение антител против белковых антигенов бруцелл в н-ИФА. Лунки полистиролового планшета (ThermoFisherScientific, США) сенсibilизировали отдельно Omp19 или ЭБА *B. abortus*. После сенсibilизации и отмывки лунок активные центры твердой фазы нейтрализовали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. Далее готовили разведения исследуемых образцов сывороток крови мышей в ЗФР-Тв, инкубировали в течение 1 часа и после отмывки планшет в лунки вносили анти-мышинный IgG антитела, меченые пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich США). Результаты реакций проявляли с помощью субстрата фермента. Реакцию считали положительной, если показатель ОП иммунной сыворотки в 2 и более раз превышал среднее значение ОП негативного контроля в разведении 1:100. В качестве негативного контроля были использованы сыворотки крови мышей иммунизированных ЗФР (контрольная группа).

Результаты исследований

Результаты изучения иммуногенности рекомбинантного белка Omp19 при использовании различных схем иммунизации беспородных белых мышей представлены в таблице 1.

Таблица 1– Иммуногенность Omp19*B. abortus* при различных схемах иммунизации белых мышей

Схема иммунизации	№ мышей	Титры антител против Omp19 на 28-ой день иммунизации
Однократная иммунизация: Omp19 <i>B. abortus</i> + ПАФ	1	1:800
	2	1:400
	3	1:800
Однократная иммунизация: Omp19 <i>B. abortus</i> + НАФ	1	1:100
	2	1:400
	3	1:400
Однократная иммунизация: Omp19 <i>B. abortus</i> + ЗФР	1	1:100
	2	1:100
	3	1:200
Двукратная иммунизация: 0 день – Omp19 <i>B. abortus</i> + НАФ 14 день – Omp19 19 <i>B. abortus</i> + ЗФР	1	1:100
	2	1:100
	3	1:200
Трехкратная иммунизация: 0 день – Omp19 <i>B. abortus</i> + ПАФ 14 день – Omp19 <i>B. abortus</i> + НАФ 21 день – Omp19 <i>B. abortus</i> + ЗФР	1	1:3200
	2	1:6400
	3	1:800

Данные таблицы 1 свидетельствуют о том, что наиболее объективные результаты об иммуногенности Omp19 бруцелл можно получить при однократном введении иммуногена в смеси с НАФ, поскольку в этом адьюванте нет клеток микобактерий. Инъекция Omp19 с ПАФ вызывает более выраженный иммунный ответ у мышей, однако усиление антителообразования, по всей вероятности, связано с общими антигенными участками между бруцеллами и микобактериями. Интересно отметить, что дополнительная инъекция препарата мышам этой группы на 14-ый день иммунизации не оказала существенного влияния на титры антител. Как видно из таблицы 1, анти-Omp19 сыворотку с высоким титром антител удалось получить после трехкратной инъекции рекомбинантного белка в смеси соответственно: ПАФ, НАФ и ЗФР.

В таблице 2 приведена иммуногенность ЭБА *B. abortus* для белых мышей при различных схемах иммунизации.

Таблица 2 – Иммуногенность ЭБА *B. abortus* при различных схемах иммунизации

белых мышей

Схема иммунизации	№ мышей	Титры антител против Omp19на 28-ой день иммунизации
Однократная иммунизация: ЭБА <i>V. abortus</i> + ПАФ	1	РО
	2	1:400
	3	1:100
Однократная иммунизация: ЭБА <i>V. abortus</i> + НАФ	1	1:400
	2	1:100
	3	1:100
Однократная иммунизация: ЭБА <i>V. abortus</i> + ЗФР	1	РО
	2	РО
	3	РО
Двукратная иммунизация: 0 день – ЭБА <i>V. abortus</i> + НАФ 14 день – ЭБА <i>V. abortus</i> + ЗФР	1	1:100
	2	1:200
	3	1:200
Трехкратная иммунизация: 0 день – ЭБА <i>V. abortus</i> + ПАФ 14 день – ЭБА <i>V. abortus</i> + НАФ 21 день – ЭБА <i>V. abortus</i> + ЗФР	1	1:3200
	2	1:12800
	3	1:1600
Примечание: РО – Реакция отрицательная		

Из таблицы 2 следует, что природный белковый антиген ЭБА *V. abortus* по своей иммуногенности уступает рекомбинантному белку Omp19*V. abortus*. Например, все 3 мыши, иммунизированные ЭБА*V. abortus*+ЗФР, не вырабатывали специфические антитела, тогда как их аналоги, иммунизированные Omp19 *V. abortus*+ЗФР, продуцировали антитела против рекомбинантного белка в титрах 1;100-1:200 (табл.1). Как видно из табл.2, антисыворотку против ЭБА *V. abortus* с высокой активностью также можно получить после трехкратной иммунизации мышей антигеном, последовательно инъецируя его в смеси ПАФ, НАФ и ЗФР. Важно отметить, что анти-ЭБА *V. abortus* антитела иммунных мышей связывались с рекомбинантным белком Omp19 в разведениях сыворотки от 1:100 до 1:800, что свидетельствует, во-первых, о наличии белка с мол.м. 19 кДа в составе ЭБА*V. abortus*, во-вторых, об экспрессии Omp19*V. abortus* штаммом-продуцентом *E. coli* в активном состоянии.

Таким образом, рекомбинантный белок Omp19*V. abortus* вызывает выраженный гуморальный иммунный ответ у мышей в виде антителообразования, и как иммуногенный белок представляет интерес в создании вакцинных и/или диагностических препаратов.

Список литературы

1 Galińska E.M., Zagórski J. Brucellosis in humans etiology, diagnostics, clinical forms // Ann. Aric. Environ. Med. 2013. Vol. 20, № 2. P. 233–238.

2 Плотникова Э.М., Салмаков К.М., Иванов А.В. Иммуномониторинг бруцеллез животных // Ж. Ветеринария (РФ). – 2010. – №5. – С.26-30.

3. Godfroid J, Nielsen K., and Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife // *Croat Med J.* 2010 Aug; 51(4): 296–305.

4 Sacchini F., B. Bonfini G. Chiarenza A. et al. False-positive reactions to serological tests for brucellosis: Analysis of antibody response to *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* O:9 in experimentally immunised sheep // Brucellosis International Research Conference: Berlin, 9-12 September, 2014.- P.118.

5. Poester FP, Nielsen K, Samartino LE, Yu WL (2010): Diagnosis of brucellosis. *Open Veterinary Science Journal* 4, 46–60. doi: 10.2174/1874318801004010046.

6 Gupta V.K., Rout P.K, Vihan V.S. Introduction of immune response in mice with DNA vaccine encoding outer membrane protein (Omp31) of *Brucella melitensis* 16M // *Research in Veterinary Science.* – 2007. – Vol.82, №3. – P.305-313.

7 Mohammadi E., Golchin M. Detection of *Brucella abortus* by immunofluorescence assay using anti outer membrane protein of 19 kDa antibody // *Adv Clin Exp Med.* – 2018. – 341p.

8 Булашев А.К., Турсунов К.Т., Каирова Ж.К., Сыздыкова А. Получение штамма продуцента рекомбинантного БВМ19 *Brucella abortus* и изучение его антигенности // *Вестник КазАТУ им.С.Сейфуллина.* – 2018.- №3(98).- С.117-127].

9 Tabatabai L.B., Deyoe D.L. Biochemical and biological properties of soluble protein preparations from *Brucella abortus* // *Developments in biological standardization.* – 1984. – Vol. 56. – P.199-211.