

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.62-65

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ БРУЦЕЛЛ В СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА

Шенжанова А. М., Сыздыкова А. С.

Бруцеллез - инфекционная, зооантропонозная, преимущественно хронически протекающая болезнь, вызываемая бактериями рода *Brucella*, проявляющаяся абортами, задержанием последа, эндометритами и расстройством опорно-двигательной системы (бурситы), у самцов - орхитами. Эпизоотологическая обстановка по бруцеллезу остается весьма напряженной в Казахстане, особенно в северных и центральных регионах, где сосредоточено 75% неблагополучных пунктов и выделяется 90% больных животных от общего количества в республике. По некоторым регионам возрастает число случаев заболевания людей, что свидетельствует о недостаточном проведении комплекса противоэпизоотических мероприятий, направленных на разрыв эпизоотической цепи (источник возбудителя инфекции, механизм передачи и восприимчивые здоровые животные, человек) [1].

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 и формулировку об эпизоотологической ситуации во всех без исключения случаях.

В последнее время в практику диагностики бруцеллеза внедряются различные варианты высокочувствительного иммунологического метода - иммуноферментного анализа (ИФА). В нем для идентификации патоген-специфических антител используются, в основном, антигены самого поверхностного слоя клеточной стенки *Brucella* spp. - гладкие липополисахариды (ЛПС). Поэтому весьма трудно дифференцировать животных, иммунизированных живыми аттенуированными вакцинами, от индивидуумов, инфицированных бруцеллезом естественным путем [2].

Более того, ИФА и традиционные тесты, основанные на использовании в качестве антигена ЛПС цельной клетки бруцелл (РА, РБП и РСК), не всегда дают надежные результаты из-за перекрестной реактивности с другими грамотрицательными бактериями, такими как *Yersinia enterocolitica* O: 9,

Escherichiacoli O157 : Н7, *Salmonellaspp.*, *Pseudomonasmaltophilia* и др. [3]. В этой связи, изучение антигенных и иммуногенных свойств ЛПС-несодержащих компонентов клеточной стенки бруцелл, а именно белков внешней мембраны (Omp), представляет большой интерес для ветеринарной науки и практики [4]. Среди известных Omp более-менее изученными являются Omp25 [5] и Omp31 [6]. Другим белком, не относящимся к известным трем группам Omp, является Omp19, а также периплазматические белки: Bp26 или Omp28 [7] и супероксиддисмутаза Cu-Zn СОД [8]. Следует отметить, что до настоящего времени вышеупомянутые белки бруцелл изучаются как потенциальные компоненты для создания вакцин. Потенциал внешне-мембранных и периплазматических белков при серологической диагностике животных все еще остается малоизученным, а полученные результаты весьма неоднозначны, порой противоречивы.

Целью данной работы являлось изучение возможности использования рекомбинантных внешне-мембранных (Omp31, Omp 25, Omp 19) и периплазматических белков (Cu-Zn СОД и Bp26) бруцелл в серологической диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований

Сыворотки крови. В работе были использованы образцы сывороток крови коров, положительно реагирующих на бруцеллез по показаниям традиционных серологических реакций (РБП, РСК), в количестве 150 гол., предоставленные РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» Комитета ветеринарного контроля и надзора МСХ РК.

Рекомбинантные белки бруцелл. В работе были использованы рекомбинантные БВМ бруцелл, полученные А.К.Булашевым и соавт.: Omp25 *B. abortus* и Omp31 *B. melitensis*[9] и Omp19 *B. abortus* [10]. Периплазматические белки *Brucellaspp.*: Bp26 и Cu-Zn СОД были любезно предоставлены ведущим научным сотрудником Национального центра по биотехнологии Республики Казахстан, к.в.н., доцентом С.З. Ескендировой.

Серологические исследования сывороток крови в н-ИФА. Лунки полистиролового планшета (ThermoFisherScientific, США) сенсibilизировали отдельно белковыми антигенами бруцелл. После сенсibilизации и отмывки лунок активные центры твердой фазы нейтрализовали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. Далее, в двух лунках готовили разведения исследуемых образцов сывороток крови в ЗФР-Тв, инкубировали в течение 1 часа и после отмывки планшет в лунки вносили анти-бычий IgG антитела, меченые пероксидазой хрена (Sigma-AldrichСША). Результаты реакций проявляли с помощью субстрата фермента. Реакцию считали положительной, если показатель оптической плотности исследуемой сыворотки (ОПис) в 2 и более раз превышал среднее значение оптической плотности контрольного образца (ОПко) в разведении 1:100. В качестве негативного контроля были использованы сыворотки крови невакцинированного 4-5 мес. молодняка крупного рогатого скота из благополучного по бруцеллезу фермы.

Результаты исследований

Результаты исследований сывороток крови 150 коров (РБП и РСК позитивных) в н-ИФА на основе внешне-мембранных и периплазматических рекомбинантных белков приведены в таблице.

Таблица – Антигенность рекомбинантных белков бруцелл для сывороток крови коров, серопозитивных на бруцеллез по РБП и РСК (n=150)

Кратность превышения ОПио над ОПко	Рекомбинантные белки бруцелл, использованные в н-ИФА				
	Omp19	Omp25	Omp31	Vp26	Cu-Zn СОД
	Количество животных с положительными результатами (гол/%)				
от 2,00 до 4,0	6/4	8/5,3	16/10,6	26/17,3	14/9,3
от 4,1 до 8,0	34/22,7	44/29	35/23	43/28	53/35
от 8,1 до 12,0	45/30,0	53/35	31/20	36/24	37/24,6
от 12,1 до 16,0	62/41,3	25/16,7	15/10	16/10,6	16/10,6
от 16,1 и выше	1/0,7	16/10,7	52/34,7	26/17,3	25/16,7
Общее количество животных с положительными результатами н-ИФА (гол/%)	148/98,7	146/97,3	149/99,3	147/98	145/96,7
Средние значения ОПио/ОПко	10,5±0,27	10,1±0,38	11,7±0,57	9,2±0,47	9,8±0,49

Как видно из таблицы, положительные результаты традиционных серологических реакций (РБП и РСК) от 96,7 до 99,3% случаях подтверждались показаниями н-ИФА, что свидетельствует о высоком серологическом потенциале рекомбинантных белков, использованных в иммуноанализе. Среди рекомбинантных белков наиболее антигенным оказался Omp31, поскольку превышение ОПио над ОПков 16,1 и более раз было установлено у 34,7% коров. Кроме того, н-ИФА/Omp31 показал наибольшую чувствительность, подтверждая результаты традиционных реакций у всех исследованных коров, за исключением одной головы. По всей вероятности, у этой коровы антитела, выявленные в РБП и/или РСК, являются неспецифическими, т.е. перекрестно реагирующими с бруцеллами из-за сходства их ЛПС молекул. По показателям **среднего значения** ОПио/ОПко (11,7±0,57) Omp31 достоверно превосходил других рекомбинантных белков (P≤0,05-0,01). Сравнительно наименьшая антигенность установлена у Omp19. Использование последнего в н-ИФА позволило выявить антитела с таким коэффициентом ОПио/ОПко только у одной головы (0,7%), хотя н-ИФА/Omp19 по своей

чувствительности (98,7%) превосходила н-ИФА/Omp25 (97,3%), н-ИФА/Vp26 (98%) и н-ИФА/Cu-Zn СОД (96,7%).

Таким образом, использованные рекомбинантные внешне-мембранные (Omp31, Omp 25, Omp 19) и периплазматические белки (Cu-Zn СОД и Vp26) бактерий рода *Brucella* обладают хорошо выраженной антигенностью по отношению к сывороткам крови коров с положительными реакциями на бруцеллез. Тем не менее, максимальная чувствительность н-ИФА установлена при использовании в нем в качестве антигена Omp31. Для дальнейшего определения диагностической ценности этого рекомбинантного белка необходимо провести серологические исследования серопозитивных животных в н-ИФА/Omp31 с последующим бактериологическим анализом патологического материала.

Список литературы

1. Иванов Н.П. Бруцеллез сельскохозяйственных животных, методы и средства борьбы с ним. – Алматы, 2002.

2. 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.

3. Erdenebaatar J, Bayarsaikhan B, Watarai M, Makino S, Shirahata T. Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals infected with *Brucella* species from those of animals infected with *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2003; 10 (4): 710-714.

4. Ko K, Kim J, Her M, Kang S, Jung S et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Veterinary Microbiology* 2012; 156 (3-4):374-380. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.11.011.

5. Cloeckaert A, Zygmunt M, Bézard G, Dubray G. Purification and antigenic analysis of the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Research in Microbiology* 1996; 147(4):225–235.

6. Gupta V, Verma D, Singh S, Vihan V. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis. *Small Ruminant Research* 2007; 70(2-3):260-266. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.01.012.

7. Manat Y, Shustov A, Evtihova E, Eskendirova S. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species. *Open Veterinary Journal* 2016; 6(2):71-77. doi:10.4314/ovj.v6i2.1.

8. Tsogtbaatar G, Tachibana M, Watanabe K, Kim R, Suzuki H et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening of canine brucellosis using recombinant Cu-Zn superoxide dismutase. *Journal of Veterinary Medical Science* 2008; 70(12):1387-1389.

9. Bulashev A., Tadeusz Jaku-bowski, Kanat Tursunov, Vladimir Kiyan, Aibek Zhumalin. Immunogenicity and antigenicity of *Brucella* recombinant outer

membrane proteins // J. VeterinarijairZootechnika (Vet Med Zoot). Т. 76 (98). 2018.-Р.17-24.

10. Булашев А.К., Турсунов К.Т., Каирова Ж.К., Сыздыкова А. Получение штамма продуцента рекомбинантного БВМ19 Brucellaabortus и изучение его антигенности //Вестник КазАТУим.С.Сейфуллина.- 2018.- №3(98).-С.117-127].

Научный руководитель: д.в.н., профессор Булашев А.К.