

«Сейфуллин оқулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми -практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.І, Ч.ІІІ. - С. 140-143

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЛИТЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В СЕРО-ДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА

Курмашева А.К., магистрант

Казахский Агротехнический университет им.С.Сейфуллина г. Нур-Султан,

Іңірбай Б.Қ., м.в.н., научный сотрудник

Национальный центр биотехнологии, г. Нур-Султан

Бруцеллез является зоонозным инфекционным заболеванием, вызываемым бактериями рода *Brucella*, и зарегистрирован в 86 государствах. Болезнь наносит огромный экономический ущерб животноводству и представляет серьезную опасность для здоровья человека. Несмотря на определенные достижения в борьбе с бруцеллезом и на имеющиеся международные стандарты в области ветеринарного контроля, разработанные Всемирной организацией по охране здоровья животных, лишь некоторые развитые страны добились искоренения бруцеллеза животных [1, 2, 3].

Раннее выявление инфицированных бруцеллезом животных является ключевым этапом в системе противобруцеллезных мероприятий. В настоящее время для этой цели в Республике Казахстан (РК) используются рутинные серологические тесты, такие как Роз Бенгал проба (РБП), реакция связывания комплемента (РСК) и реакция агглютинации (РА). Следует отметить неудачный опыт внедрения в диагностическую практику РК коммерческих наборов иммуноферментного анализа (к-ИФА-наборы) на основе липополисахаридов гладких бруцелл (S-ЛПС) в 2008-2013 гг. В этот период количество животных, положительно реагирующих на бруцеллез, увеличилось в несколько раз, однако улучшения эпизоотической ситуации не наблюдалось. Практика показала, что ИФА, как один из высокочувствительных тестов, может быть введен в серодиагностику бруцеллеза только при наличии специфичного для возбудителя антигена [4].

S-ЛПС бруцелл является самым сильным антигеном по сравнению с другими молекулами патогена. К сожалению, классические серологические тесты, основанные на ЛПС, дают ложноположительные результаты из-за сходства этого антигена бруцелл с таковыми у других грамотрицательных бактерий [5]. Поэтому, поиск антигена, уникального для бруцелл остается одной из актуальных задач мировой ветеринарной науки и практики. Обзор современной литературы в этой области за последние три года показывает, что среди неполисахаридных антигенов бруцелл наиболее перспективными с

диагностической точки зрения являются белковые компоненты, а именно белки внешней мембраны (БВМ) [6]. На сегодняшний день наиболее эффективным методом получения *Brucella*-специфичных белков является использование штаммов прокариотов, продуцирующих рекомбинантные белки патогена. Однако, применение в непрямом ИФА (н-ИФА) одиночных рекомбинантных белков бруцелл снижает его чувствительность. Это возможно из-за «пропуска» антител, специфичных к другим белкам. Данные наблюдения явились основанием для испытания комбинации двух или трех рекомбинантных белков в качестве единого антигена при исследовании сывороток крови на противобруцеллезные антитела. Сравнительные исследования антигенности одиночных и комбинированных белков показали более высокую чувствительность н-ИФА в случае использования в нём комбинации БВМ19+БВМ31 и БВМ25+БВМ31 [7,8]. Использование в н-ИФА двух и более рекомбинантных белков, хотя и способствует повышению его чувствительности, но ведет к удорожанию себестоимости серологических исследований. В этой связи, были получены штаммы *E. coli*, продуцирующие отдельные слитые белки, каждый из которых состоял из иммунодоминантных участков двух БВМ [9].

Целью настоящего исследования явилось определение диагностической ценности слитых рекомбинантных белков бруцелл БВМ19/25, БВМ19/31, БВМ25/31, полученные А.К. Булашевым и соавт. (2021) [9] в н-ИФА в сравнении с традиционными серологическими реакциями (РБП, РСК и РА) при исследовании сывороток крови крупного рогатого скота (КРС) и овец.

Всего было использовано 426 сывороток крови, любезно предоставленные Национальным референтным центром по ветеринарии МСХ РК. Из них 213 образцов были взяты от КРС, и столько же проб – от овец. Среди них по 88 сывороток КРС и овец имели отрицательные результаты на бруцеллез по РБП и РСК, а также коммерческому ИФА-набору (к-ИФА) (*INgezimBrucella-Comtras 2.0, Испания*) и были взяты от невакцинированных животных благополучных по бруцеллезу стада и отары, соответственно; 50 образцов сывороток крови КРС и/или овец были положительными на бруцеллез по показаниям двух (РБП и к-ИФА) или трех серологических тестов (РБП, РБП и к-ИФА); по 75 сывороток крови КРС и овец принадлежали животным из свежих очагов бруцеллезной инфекции с неизвестными серологическими результатами. Сыворотка крови телки, экспериментально зараженной вирулентным штаммом *V.abortus 544*, любезно предоставлена заведующим лабораторией профилактики инфекционных заболеваний НИИ проблем биологической безопасности РК, профессором К. Табыновым. Сыворотки хранили при температуре -20°C до использования.

Для серологических исследований сывороток крови КРС и овец в н-ИФА лунки полистиролового планшета покрывали слитыми рекомбинантными белками в концентрации 1,0 мкг/мл в бикарбонатном буфере (рН 9,6) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем в лунки вносили сыворотки КРС и/или овец в фиксированном разведении 1:100 в забуференном физиологическом растворе с добавлением твина-20. После чего планшет вы-

держивали при 37°C в течение 1 часа. В качестве вторичных антител использовали кроличье антитело против бычьего IgG (*Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США*) и/или ослиное антитело против овечьего IgG (*Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США*). Для определения порогового значения (cutoff) оптической плотности (ОП) вычисляли среднюю ОП лунок с негативными сыворотками КРС (n = 88) и/или овец (n = 88) при 492 нм, а затем прибавляли к этой медиане утроенное показание стандартного отклонения (СО) ОП негативных сывороток: пороговая ОП (cutoff) = средняя ОП негативных сывороток при 492 нм + 3 × СО. Все анализы проводились в трех повторах.

Образцы сыворотки крови животных с неизвестными результатами на бруцеллез исследовали с помощью РБП в соответствии с Межгосударственным стандартом (ГОСТ 34105-2017) в нашей модификации, исключаящей феномен прозоны. Сравнения между средними значениями ОП были проанализированы с использованием t-критерия Стьюдента. Статистическую значимость принимали на уровне $p < 0,05$.

Результаты изучения чувствительности, специфичности и точности н-ИФА на основе слитых белков показали, что при тестировании сывороток крови КРС высокая точность обнаружения антител против бруцелл отмечается при использовании в качестве антигена БВМ19/31. Чувствительность иммуноанализа увеличивалась с возрастанием кратности разведения сывороток. При этом, низкую чувствительность показал БВМ19/25. По специфичности БВМ25/31 уступал другим белкам, хотя он придавал н-ИФА наибольшую чувствительность, т.е. данный антиген лучше определял положительные сыворотки, однако в отрицательных сыворотках, в отдельных случаях, показывал ложноположительные результаты. В целом, БВМ19/31, по сравнению с двумя другими рекомбинантными белками, оказался более подходящим антигеном для определения *Brucella*-специфических антител в сыворотке крови КРС.

Специфичность н-ИФА на основе БВМ19/31 при анализе сывороток крови овец достигала 70%, что является самым высоким показателем среди использованных слитых белков. При этом точность иммуноанализа при использовании данного белка была несколько ниже по сравнению с БВМ19/25, хотя последний антиген был более чувствителен. Что касается БВМ25/31, то его результаты по трем оцениваемым параметрам оказались достоверно ниже.

Для оценки диагностической ценности н-ИФА были исследованы сыворотки крови КРС и овец с отрицательными (по 88 гол.) и положительными (по 50 гол.) результатами на бруцеллез по РСК, РБП, РА и к-ИФА-набора. Как показали результаты валидации, относительно низкую чувствительность, специфичность и точность имеет вариант н-ИФА/БВМ25/31. *Brucella*-специфичные антитела в сыворотках крови КРС лучше детектировались н-ИФА/БВМ19/31. Однако при исследовании сывороток крови овец использование БВМ19/25 давало более предпочтительные результаты, чем БВМ19/31. Так, например, БВМ19/31 по своей чувствительности (42-44%), точности (79-81%) уступал БВМ19/25: 72-76% и 89-91%, соответственно.

Таким образом, слитые рекомбинантные белки бруцелл имеют различную антигенность по отношению к противобруцеллезным антителам в зависимости от вида животных. Наиболее подходящим антигеном для н-ИФА при серологических исследованиях КРС и овец являются БВМ19/31 и БВМ19/25, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования указанных антигенов в серодиагностике бруцеллеза, однако необходимы дальнейшие широкомасштабные исследования с использованием бактериологического анализа и/или полимеразной цепной реакции для определения диагностических характеристик этих белков и возможности внедрения н-ИФА в качестве замены РБП и РСК, используемых на первом этапе исследований животных на бруцеллез в соответствии с Ветеринарными правилами РК.

Список использованной литературы

- 1.Литусов, Н. В. Возбудители бруцеллеза: иллюстрированное учебное пособие [текст] / Н. В. Литусов. – Екатеринбург: УГМА, 2012. – 38 с.
- 2.Khan M.An Overview of Brucellosis in Cattle and Humans, and its Serological and Molecular Diagnosis in Control Strategies [text]/ Khan M., Zahoor M. // Tropical Medicine and Infectious Disease. – 2018. – Vol. 3(2). – P. 65.
- 3.Zhang N. Animal brucellosis control or eradication programs worldwide: A systematic review of experiences and lessons learned [text] /Zhang N., Huang D., Wu W., Liu J., Liang F., Zhou B., Guan P. // Preventive Veterinary Medicine. – 2018. – Vol. 160. – P. 105-115.
- 4.Андыбаева С. Изучение иммуногенности белков внешней мембраны бруцелл [текст] // Матер. Респуб. научно-теорет. конф. «Сейфуллинские чтения-13: сохраняя традиции, создавая будущее». – Астана, 2017. – Т. 1(6). – С. 181-183.
- 5.Singh D., Yadav S.K., Sharma L. Cloning, expression, purification and immunochemical characterization of Brucella abortus 28kDa Omp encoding gene [text]/ Singh D., Yadav S.K., Sharma L // Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. – 2020. – Vol. 7(7). – P. 61-68.
- 6.Baldi P. Limited diagnostic usefulness of antibodies to cytoplasmic proteins of brucella in early-treated human brucellosis [text] /Baldi P., Giambartolomei G., Wallach J., Velikovsky C., Fossati C.// Scandinavian Journal of Infectious Diseases. – 2001. – Vol. 33(3). – P. 200-205.
- 7.Булашев А.К. Изучение антигенности белков бруцелл в иммуноферментном анализе /Булашев А.К., Сыздыкова А.С., Сураншиев Ж.А., Турсунов К.А., Ескендирова С.З. // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2019. – №1. – С. 92-100.
- 8.Булашев А. Антигенность белков внешней мембраны бруцелл /Булашев А., Сураншиев Ж., Жумалин А., Турсунов К. // Биотехнология, теория и практика. – 2016. – №1. – С. 20-26.
- 9.Bulashev A.K. Evaluation of chimeric proteins for serological diagnosis of brucellosis in cattle [text] /Bulashev A.K., Ingirbay B.K., Mukantayev K.N. and Syzdykova A.S. // Vet. World. – 2021. – Vol. 14(8). – P. 2187-2196.

