

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті

ӘОЖ 619:579.255:378.245

Қолжазба ретінде

ІҢІРБАЙ БАҚЫТҚАЛИ ҚАБИҰЛЫ
«Мультипротеинді рекомбинант антигенін бруцеллездің серологиялық
балауында қолдану»

6D120100 – Ветеринариялық медицина

Философия докторы (PhD)
дәрежесін алуға арналған диссертация

Ғылыми кеңесші:
Ветеринария ғылымдарының докторы,
профессор А. Қ. Бұлашев

Шетелдік ғылыми кеңесші,
Қытай ауыл шаруашылығы ғылымдары
академиясының Харбин ветеринария
ғылыми-зерттеу институтының
профессоры, PhD., профессор Xiaojun
Wang

Қазақстан Республикасы
Астана, 2022

МАЗМҰНЫ

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР	4
АНЫҚТАМАЛАР	5
БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР	7
КІРІСПЕ	9
1 ӘДЕБИ ШОЛУ	14
1.1 <i>Brucella</i> тұқымы бактерияларының таксономиясы.....	14
1.2 Бруцеллез қоздырғышының антигендік құрылымы және оның диагностикалық маңызы.....	21
1.3 Бруцеллезді дәстүрлі серологиялық балау тәсілдері.....	31
1.4 <i>Brucella</i> -ның рекомбинантты ақуыздары және оларды серологиялық диагностиканы жетілдіруде қолдану.....	36
1.5 Әдеби шолу бөлімі бойынша қорытынды.....	42
2 ӨЗІНДІК ЗЕРТТЕУЛЕР	44
2.1 Зерттеу материалдары мен әдістері.....	44
2.1.1 Зерттеу материалдары.....	44
2.1.2 Зерттеу әдістері	47
2.2 Өзіндік зерттеу нәтижелері	54
2.2.1 Қазақстан Республикасындағы бруцеллез бойынша эпизоотиялық жағдайдың қысқаша сипаттамасы және аурудың серодиагностикасы.....	54
2.2.2 <i>Brucella</i> -ның жалқы рекомбинантты сыртқы мембрана ақуыздарының салыстырмалы сипаттамасы.....	63
2.2.3 Бруцеллалардың рекомбинантты мультипротеиндерін алу және олардың серологиялық әлеуетін бағалау.....	71
2.2.3.1 СМА25+19, СМА19+31 және СМА25+31 ақуыздарының синтезіне жауапты гендердің генетикалық конструкцияларын құрастыру.....	71
2.2.3.2 СМА25+19, СМА19+31 және СМА25+31 гендерін экспрессиялық векторға клондау.....	77
2.2.3.3 СМА25+19, СМА19+31 және СМА25+31 гендердің өндіруші штамдағы индукциясын анықтау.....	80
2.2.3.4 СМА25+19, СМА19+31 және СМА25+31 гендерін экспрессиялық векторға клондау.....	81
2.2.4 Сиыр және қой бруцеллезін балауда мультипротеиндер негізіндегі иммунды-ферменттік талдау нұсқаларының диагностикалық құндылығын зерттеу	90
2.2.5 Бруцеллезді балауға арналған ИФТ жиынтығының тәжірибелі үлгісін салыстырмалы сынау.....	96
2.3 Зерттеу нәтижелерін талқылау.....	97
ҚОРЫТЫНДЫ	106
ҚОЛДАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	108
А-ҚОСЫМШАСЫ	125
Ә-ҚОСЫМШАСЫ	127

Б-ҚОСЫМШАСЫ.....	130
В-ҚОСЫМШАСЫ.....	134
Г-ҚОСЫМШАСЫ.....	135
Д-ҚОСЫМШАСЫ.....	141
Е-ҚОСЫМШАСЫ.....	142

НОРМАТИВТІ СІЛТЕМЕЛЕР

Бұл диссертация келесі стандарттарға сілтемелерді пайдаланады:

- МемСТ 25385-91: Ауыл шаруашылығы жануарлары. Бруцеллезді диагностикалау әдістері;
- МемСТ 33216-2014: «Жануарларды күтіп бағу бойынша нұсқаулар: зертханалық кеміргіштер мен қояндарға арналған түрлерге арналған ережелері»;
- 2019 жылдың 23 мамырындағы №206 Қазақстан Республикасының Ауыл шаруашылығы министрінің "Ветеринариялық (ветеринариялық-санитариялық) ережелерін бекіту туралы" бұйрығы, 2019 жылы 9 маусымда № 7-1/587 Қазақстан Республикасының Әділет министрлігі бекіткен.

АНЫҚТАМАЛАР

Диссертациялық жұмыста төменгі анықтамалары бар келесі терминдер қолданылды:

Антигенділік – антигендердің әртүрлі серологиялық реакцияларда немесе *in vitro* жағдайында жасушалық рецепторлардың молекулаларымен телімді түрде әрекеттесе алу қабілеті.

Биоинформатика - биологиялық деректерді сақтау, жинау, ұйымдастыру және талдауға арналған әдістерді әзірлеп, жетілдіретін пәнаралық сала.

Ген – Ген (ежелгі грекше γένος - текті) - организмнің белгілі бір белгісі немесе қызметі туралы ақпарат алып жүретін тұқым қуалаушылықтың құрылымдық-қызметтік бірлігі болып табылатын тұқым қуалайтын фактор.

Ген экспрессиясы – геннен алынған тұқым қуалайтын ақпараттың функционалды өнімге – РНҚ немесе ақуызға айналу процесі. Ген экспрессиясының кейбір кезеңдерін (транскрипцияны, трансляцияны, РНҚ сплайсингін және ақуыздардың трансляциядан кейінгі модификациясы кезеңін) реттеуге болады.

Гистидин – Гистидин - молекуласында имидазол қалдығының болуына байланысты әлсіз негіздік қасиеттері бар хош иісті альфа-амин қышқылы.

Иммуногенділік – Иммуногенділік – антигеннің иммундық жауапты тудыратын потенциалды қабілеті Иммуногенділік дәрежесі факторлардың үш тобына байланысты: антигеннің молекулалық сипаттамасына, антигеннің организмдегі кинетикасына және макроорганизмнің реактивтілігіне.

Мультипротеин немесе химерлік ақуыз – екі немесе одан да көп ақуыздардың эпитоптарынан құралған антиген.

Плазмидалар – геномдық хромосомалардан физикалық түрде бөлек және өздігінен көбейе алатын кішкене ДНҚ молекулалары. Әдетте плазмидалар бактерияларда кездеседі және екі тізбекті сақиналы молекулалар болып табылады.

Рекомбинантты ақуыз – рекомбинантты ДНҚ технологиясы арқылы құрастырылатын табиғи ақуыздардың аминқышқылдарының тізбегінен тұратын аналогы.

Рибосома – ақуыз синтезін жүзеге асыратын жасушаішілік органоид.

Сезімталдылық – серологиялық немесе иммунологиялық сыналымдардың зерттеуге алынған оң нәтижелі үлгілердің арасынан антиденелерді немесе антигендерді анықтай алуының пайыздық көрсеткіші.

Серологиялық зерттеулер – қан сарысуындағы немесе басқа да биологиялық сұйықтықтарда белгілі бір антиденелерді немесе антигендерді анықтауға арналған иммунитеттің реакциялар.

Телімділік – антиген мен антидененің бір-бірімен таңдамалы түрде әрекеттесе алу қасиеті.

Трансформация – дезоксирибонуклеин қышқылының көмегімен генетикалық ақпаратты қандай да бір жасушаға ендіру процесі.

Тиоредоксин - Тиоредоксиндер – архейлерден адамға дейінгі барлық организмдерде болатын ұсақ ақуыздар тобы. ДНҚ технологиясында ол

рекомбинантты ақуыздың продуцент штаммының жасушаларына уыттылығын төмендетеді, сонымен қатар ақуыздың және гистидин белгісінің ерігіштігін арттырады.

Титр –антиденелердің антигенмен әрекеттесу белгісі байқалатын биологиялық сұйықтықтың ең жоғарғы сұйылтынымы.

Трансформация –бактерия жасушасының сыртқы ортадан бөгде ДНҚ молекуласын сіңіру процесі. Трансформацияға қабілетті болу үшін жасуша компетентті болуы керек, яғни ДНҚ молекулалары мембрана арқылы жасуша ішіне ене алуы керек.

Фенотип - ағзаның онтогенез барысында қалыптасқан барлық белгілері мен қасиеттерінің жиынтығы. Фенотип ағзаның тұқым қуалау негізі болып табылатын генотип пен сол ағзаның тіршілік етіп жатқан қоршаған орта жағдайларының өзара әрекеттесуінен пайда болады.

Хроматография – қоспадағы заттарды бір-бірінен ажыратуға қолданылатын физикалық-химиялық әдіс. Бұл әдістің көмегімен аминқышқылдарын, ақуыздарды, ферменттерді тағы басқа заттарды таза күйінде бөліп алуға болады.

Штамм-өндіруші – биотехнологиялық өндірісті жүзеге асыруға арналған биологиялық объекті, оның табиғаты мен физиологиялық және биоимикалық қасиеттері мақсатты өнімнің сапалық сипаттамаларын анықтайды.

Эпитоп немесе детерминанта – бөгде молекулалардың құрамындағы антиденелердің комплементарлық белсенді орталықтарымен өзара әрекеттесуге қабілетті аминқышқыл қалдықтарының немесе полисахаридтердің тізбектердің белгілі бір бөлігі.

Электрофорез –сыртқы электр өрісінің әсерінен сұйық немесе газ тәрізді ортадағы дисперстік фаза бөлшектері қозғалысының электрокинетикалық құбылысы.

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

Осы диссертациялық жұмыста келесі анықтамалар, белгілеулер және қысқартулар қолданылады:

АР	-	агглютинация реакциясы
АБА	-	Арнайы бруцеллез антигені
БКЕ	-	Бикарбонатты ерітінді
БФЕ	-	буферленген физиологиялық ерітінді
БФЕ-Тв	-	буферленген физиологиялық ерітінді 0,05% твином-20
ҒЗЖ	-	ғылыми-зерттеу жұмысы
ДНҚ	-	дезоксирибонуклеин қышқылы
ДСН	-	додецилсульфат натрия
ДСН-ПААГ	-	натрий додецилсульфатыны қосылған полиакриламидті гель
ЕФП	-	Ерігіш ақуыздар препараттары
ж-ИФТ	-	жанама иммуноферменттік талдау
ИЛ	-	Интерлейкин
ИПТГ	-	изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
ИФТ	-	Иммуноферменттік талдау
ИФР	-	иммунофлюоресценция реакциясы
ВБЖҚК	-	Ветеринариялық бақылау және қадағалау комитеті
КБР	-	комплементті байланыстыру реакциясы
кДа	-	Килодальтон
ҚР АШМ	-	Қазақстан Республикасының Ауыл шаруашылық министрлігі
ЛА	-	латекс агглютинациясы
ЛПС	-	липополисахаридті антиген
ЛБ қоректік ортасы	-	Лурия-Бертани қоректік ортасы
МКА	-	моноклональды антидене
мкг	-	Микрограмм
мкл	-	Микролитр
мл	-	Милилитр
мМ	-	миллимоль на литр
мол.м.	-	Молекулалық салмақ
н.т.	-	Нуклеотидтік тізбек
ОТ		Оптикалық тығыздық
ОТШМ	-	оптикалық тығыздықтың шекті мәні
О-ПС	-	О-полисахаридті антиген
ОФД	-	Ортофенилендиамин
О-ЛПС	-	О-липополисахарид
ПААГ	-	полиакриламидті гель

ПТР	- Полимеразды тізбекті реакция
pCMA	- рекомбинантты сыртқы мембрана ақуызы
PBC	- роз-бенгал сынамаcы
P-ЛПС	- Қатпарлы липополисахарид
CMA	- сыртқы мембрана ақуызы
TФА	- Толық фрейнд адьюванты
TeAF	- Толық емес фрейнд адьюванты
ІҚМ	- Ірі қара мал
IgG	- иммуноглобулин G

КІРІСПЕ

Жұмыстың өзектілігі. Бруцеллез — убиквитарлық инфекция. Аурудың Арктикадан Жаңа Зеландия мен Отты жер аралдарына дейін таралуы оның қоздырғышының кең бейімделу мүмкіндіктерін дәлелдейді. Барлық континенттерде, әсіресе Жерорта теңізінде, Шығыс Европада, Оңтүстік және Орталық Америкада, Африкада, Орталық және Оңтүстік Азияда, Кавказда, Араб түбегінде және Таяу Шығыста мұндай деңгейде кең таралған басқа ауруды атау мүмкін емес [1].

Қазақстан Республикасы (ҚР), сонымен қатар бұрынғы Кеңес Одағының басқа да Азия республикалары, бруцеллез ауру бойынша ең жоғарғы елдер қатарына кіреді [2]. ҚР 2383 ауылдық аймақтарының 1513-інде (63,4%) жануарлардың бруцеллезі тіркелген. Елімізде 2017-2019 жылдары 111 мың ірі қара мал басына бруцеллез диагнозы қойылды, ал орташа ауру деңгейі 0,45%-ға тең болды. Қойлардың бруцеллезбен ауыру динамикасы кейінгі жылдары біршама төмендеді және қазіргі уақытта 0,07%-ды құрап отыр. Осы кезеңде барлығы 52 мыңға жуық қой бруцеллезге шалдығу себебінен пышаққа ілінді. Бруцеллез зоонозды ауру ретінде ҚР мал шаруашылығы саласына зор экономикалық зиян келтіргенімен қатар, тұрғылықты халық денсаулығына да қауіп төндіруде: 100 мың тұрғынға есептегенде бруцеллезбен ауыратындардың саны елдің өңірлеріне байланысты 1,9 дан 4,9-ға дейін ауытқиды [3].

Бруцеллезбен жұқтырылған жануарларды ерте балау аурумен күресудің негізгі буыны болып табылады. Қазіргі таңда осы мақсатта ҚР дәстүрлі серологиялық реакциялар, атап айтсақ роз-бенгал сынамасы (РБС), комплементті байланыстыру реакциясы (КБР) және агглютинация реакциясы (АР) қолданылады. Жоғарыда аталған серологиялық реакцияларда антиденелер бруцеллалардың S-формадағы жасушаларынан дайындалған бірыңғай антигеннің көмегімен анықталады. Осы себептен классикалық серологиялық реакциялар, сондай-ақ липополисахаридті (ЛПС) антигенінің негізінде әзірленген коммерциялық ИФТ жинтықтары ауруды балау кезінде тек бруцеллаларға ғана емес, сонымен қатар басқа да грам теріс бактериялардың полисахаридті антигендеріне бағытталған антиденелерді анықтап, жалған нәтижелер беруі мүмкін. Айталық, бруцеллалардың тегіс штамдарының липополисахаридтеріне (S-ЛПС) негізделген коммерциялық ИФТ жиынтықтарын еліміздің ветеринария практикасына енгізу (2008-2013) сәтсіздікпен аяқталған болатын. Бұл кезеңде бруцеллезге ИФТ бойынша оң нәтиже көрсеткен мал саны 7 есеге дейін өскен еді [4]. Бұл оқиға ИФТ - жоғары сезімтал әдістердің бірі ретінде, қоздырғышқа телімді антиген болған жағдайда ғана бруцеллездің серодиагностикасында қолданыс таба алатындығын дәлелдеп берді. Сондықтан, бруцеллез қоздырғышына телімді антигенді қолдануға негізделген отандық ИФТ-сынамасын әзірлеу – ҚР үшін ғана емес, осы індеттен экономикалық және әлеуметтік зардап шегіп отырған басқа да елдердің ветеринария ғылымдарының өзекті мәселелерінің бірі болып табылады.

Соңғы 3 жылда жарыққа шыққан заманауи әдебиеттерге шолу бруцеллез диагностикасын жетілдіру үшін қоздырғыштың полисахаридті емес антигендерінің арасында табиғи ақуыздар [5], сыртқы мембрананың рекомбинантты ақуыздары [6, 7] және басқа ақуыздар [8, 9, 10, 11] үлкен қызығушылық тудырып отырғандығын көрсетеді. Алайда, бруцеллезді балауда осы ақуыздардың диагностикалық маңыздылығы бүгінгі күнге дейін жан-жақты зерттелмей отыр [12]. Бүгінгі күні бруцеллалардың рСМА-ның айқын гуморальды иммундық жауапты тудыра алу қабілеттілігін көрсететін бірқатар жұмыстар белгілі [13, 14, 15] және олардың кейбіреулері эпитоптық [16] және векторлық [17] вакциналар құрастыру үшін қолданылып жатыр. Ал, аурудың диагностикасына келетін болсақ, бруцеллалардың жалқы рСМА-дары олардың құрама [18, 19] және мультиэпитопты (химерлі) рекомбинантты ақуыздармен ауыстырыла бастады [20]. Соңғы ақуыздар, сөзсіз, бруцелланың интегралды антигені ретінде құрама ақуыздарға қарағанда өндірілуінде де, серологиялық диагностикада қолдануында да біршама артықшылықтарға ие. Мысалы, рСМА16, рСМА31, рСМА2в және рВР26 ақуыздарының эпитоптарынан құрастырылған химерлі антиген тышқандардың анти-*Brucella* антиденелерін анықтау мақсатында сыналған. Мұндай ақуыздың тұтас жасушалық антигенмен салыстырғанда сезімталдығы төмен болса да, телімділігі жағынан біршама жоғары болған [20]. Сиыр мен ешкілердің бруцеллезінің серодиагностикада аталмыш ақуызды нүктелі ИФТ-інде қолдану болашағынан үлкен үміт күттіретін нәтижелер берді [21]. рСМА22, рСМА25 және рСМА31 ақуыздарының иммунодоминантты эпитоптарынан құрастырылған гибриді антиген адам бруцеллезінің серодиагностикасына жарамдылығын анықтау үшін сынақтан өткізілген. Аталған мультиэпитопты ақуыз ИФТ және вестерн-блоттингте дені сау адамдар мен ауруға ұшыраған пациенттердің қан сарысуларын зерттеулерде жақсы сезімталдық пен телімділігін көрсеткен [22]. Демек, *Brucella*-ның мультипротеиндері ауру қоздырғышына телімді антиденелерді нақты және тиімді түрде анықтай алатын антиген ретінде бруцеллездің серологиялық диагностикасында қолданыс табуы әбден мүмкін.

Зерттеудің мақсаты: *Brucella* тұқымдасы бактерияларының сыртқы мембранасының рекомбинантты мультипротеиндерін экспрессиялайтын ішек таяқшасының өндіргіш-штаммдарын алу және мақсатты өнімдердің қоздырғыш антигені ретінде мал бруцеллезінің серологиялық диагностикасындағы құндылығын зерттеу.

Зерттеу міндеттері:

1. Бруцеллалардың рекомбинантты сыртқы-мембраналық және периплазмалық ақуыздарының салыстырмалы иммунологиялық сипаттамасы мен серологиялық әлеуетін зерттеу;

2. *Brucella* тұқымдасы бактерияларының рСМА19, рСМА25 және рСМА31-інің иммунодоминантты аймақтарын анықтау және қоздырғыштың рСМА19+25, рСМА19+31 және рСМА25+31 химерлі (мультипротеинді) ақуыздарының синтезіне жауапты гендердің нуклеотидтік тізбегінің *in silico* жағдайында гендік-инженерлік дизайнын жасау;

3. pET28 плазмидінің құрамына синтезделген нуклеотидтік тізбектерді клондау және бруцеллалардың мультиэпитоптық pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+31 ақуыздарының *E.coli* BL21(DE3) жасушасындағы экспрессиясына қол жеткізіп, мақсатты өнімдерді өндірудің оңтайлы параметрлерін анықтау;

4. Бруцеллалардың рекомбинантты ақуыздарының зертханалық жануарларға антигенділігі мен иммуногенділігін зерттеу;

5. Дәстүрлі серологиялық реакциялар бойынша бруцеллезге оң және теріс нәтиже көрсеткен сиыр мен қой малының қан сарысуларын қолдана отыра ж-ИФТ-де *Brucella*-ның ақуыздарының (pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+31) жалқы ақуыздарымен (pCMA19, pCMA25 және pCMA31) салыстырмалы түрде антигенділігін анықтау;

6. Бруцеллалардың мультипротеинді рекомбинантты антигендеріне негізделген ИФТ-інің серологиялық әлеуетін сиыр мен қой малын бруцеллезге дәстүрлі әдістермен тексеру кезінде бағалау.

Диссертациялық жұмыстың ғылыми жаңалығы - алғаш рет бруцеллез қоздырғышының молекулалық салмақтары 19 кДа, және 31 кДа болатын CMA-ның иммунодоминантты фрагменттерінен құрастырылған ақуызды синтездейтін прокариоттық өндіргіш штамм алынып, бұл антиген мал бруцеллезін балауға арналған телімді және сезімтал ИФТ-ын әзірлеуде қолданылды.

Практикалық құндылығы. Өнертабысқа өтінім беруге байланысты *E. coli* BL21(DE3)/pET28 pCMA19+31 штаммын ҚР БҒМ ҒК "Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы" РМК-ы тіркеуге алынды (№В-РКМ 00913, А-Қосымшасы) және ҚР №35776 патентімен қорғалды (Ө-Қосымшасы). Аталмыш өндіргіш-штаммды бруцеллезді диагностикалауға арналған иммунологиялық сыналымдарды дайындау кезінде телімді антигенінің көзі ретінде пайдалануға болады.

Рекомбинантты ақуыздың негізінде әзірленген "Бруцеллезді диагностикалауға арналған ИФТ-жиынтығын" дайындау мен пайдаланудың зертханалық регламенті "С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті" КеАҚ-ның (ҚазАТУ) ғылыми-техникалық комиссиясының отырысында бекітілді (23.09.2022 жылғы №9 хаттама, Б-Қосымшасы) және аталмыш жиынтықтың тәжірибелі үлгісі дайындалды (В-Қосымшасы).

Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері ҚазАТУ-інің 6M070100 "Биотехнология" мамандығы магистранттарына арналған "Modern problems of Biotechnology in Veterinary medicine and Animal husbandry" атты оқу құралының «The new methods for diagnosis of brucellosis» атты бөліміне енгізілді (Г-Қосымшасы) және 6D120100 – "Ветеринариялық медицина" мамандығы докторанттарына "General Immunology" пәндері бойынша дәрістік және зертханалық сабақтарды жүргізуде қолданыс тапты. Сонымен қатар, "Бруцеллезді диагностикалауға арналған ИФТ-жиынтығын" дайындау технологиясы ҚазАТУ-нің «Ауылшаруашылығы биотехнологиясы ғылыми зерттеу платформасының» ҒЗЖ-ына енгізілді (Д-Қосымшасы).

Қорғауға шығарылатын негізгі қағидалар:

1. pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+31 мультипротеиндерінің синтезі және олардың *E.coli* BL21(DE3) жасушаларында түзілуі;
2. *Brucella* тұқымдасы бактерияларының жалқы (pCMA19, pCMA25, pCMA31) және және химерлі (pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+31) ақуыздарының салыстырмалы түрде антигенділігі мен иммуногенділігі;
3. Мультипротеинді рекомбинантты антигендердің сиыр мен қой бруцеллезінің ИФТ диагностикасындағы салыстырмалы құндылығын анықтау;
4. *E.coli* BL21(DE3)/pET28 pCMA19+31 - *Brucella* тұқымдасына жататын бактериялардың диагностикалық маңызы жоғары рекомбинантты ақуызын өндіруші штамм.

Жұмыстың апробациясы. Зерттеу нәтижелері мына төменгі халықаралық конференцияларда баяндалды:

- С. Сейфуллиннің 125 жылдығына арналған "Сейфуллин оқулары – 15: Жастар, ғылым, технологиялар - жаңа идеялар мен перспективалар" (2019 ж.19 карашасы);

- ҚР еңбек сіңірген қайраткері Т.М. Досмұхамбетовтың 70 жылдығына арналған "Ғылым, өндіріс, бизнес: "Байсерке-Агро" агрохолдингінің мысалында аграрлық сектордың инновациялық дамуының қазіргі жағдайы мен жолдары (2019 ж.4-5 сәуірі);

- профессор В. И. Пионтковскийді еске алуға арналған "Қазіргі заманғы аграрлық ғылым мен ветеринарияның өзекті мәселелері мен даму үрдістері" (2021 ж., 18 маусымы).

Сонымен қатар, жұмыстың негізгі нәтижелері «Ветеринариялық медицина ғылымы мен технологиясы бойынша қытайлық және қазақстандық докторанттар мен магистранттардың бірінші онлайн академиялық форумында баяндалды [The first China-Kazakhstan Veterinary Medicine Science and Technology Postgraduate Academic Forum] (2022 ж.28 мамыры).

Зерттеу нәтижелерін жариялануы. Зерттеудің негізгі нәтижелері 12 ғылыми еңбектерде, атап айтсақ 5-еуі ҚР Білім және ғылым министрлігінің Ғылым комитеті ұсынған басылымдарда, 3-еуі Scopus деректер базасына енгізілген журналдарда (Veterinary World – 2 және Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences - 1), ал республикалық және халықаралық конференциялар материалдарында тиісінше 1 және 3 мақалалар жарияланды.

Диссертацияның көлемі мен құрылымы. Диссертация компьютер мәтінінің 160 бетінде жазылған. Диссертация «Кіріспе», «Әдеби шолу», «Материалдар мен әдістер», «Өзіндік зерттеулер», «Қорытынды», «Қолданылған әдебиет тізімі» және «Қосымшалар» бөлімдерінен тұрады. Жұмыста 219 әдебиет көзі, 7 Қосымшалар, 17 кестелер және 26 суреттер пайдаланылған.

Диссертациялық жұмыс 2018-2020 жылдарға арналған О.0810 "Ауыл шаруашылығы мен ветеринарияға арналған жаңа препараттар мен инновациялық биотехнологияларды жасау" атты ҚР БҒМ-нің ғылыми-техникалық бағдарлама шеңберіндегі "Құрама рекомбинантты антигенге

негізделген бруцеллездің серологиялық диагностикасы» тақырыбы бойынша орындалды (мемлекеттік тіркеу №:0118РК00970).

1 ӘДЕБИ ШОЛУ

1.1 *Brucella* тұқымы бактерияларының таксономиясы

Бруцеллез – *Brucella* тұқымдасының бактерияларымен туындайтын зооноздық ауру. Бруцеллез әдетте жануарлардың репродуктивтік жүйесін зақымдайды, түсік түсіреді және өнімділігін төмендетеді. Адам бруцеллезі жүйке, жүрек-қантамыр жүйесі мен остеоартикулярлық аппараттың созылмалы патологиясымен сипатталады. Ауру адамның еңбекке қабілеттілігінің ішінара немесе толық жоғалуына әкеледі [23]. *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* және *B. canis* – жануарлардан адамға берілетін бруцеллалардың ең көп таралған түрі [24]. Адам бруцеллезінің дәстүрлі таралу аймақтарына Таяу Шығыс, Оңтүстік Америка, Сахараның оңтүстігіндегі Африка елдері мен Жерорта теңізі бассейнінің мемлекеттері кіреді. Дегенмен, бруцеллездің жаһандық эпидемиологиясы соңғы 15 жылда айтарлықтай дамып, адам бруцеллезінің жаңа ошақтары Орталық Азияда да пайда болды. Әлем бойынша адам бруцеллезі кең таралған он елдің бесеуі осы аймақта орналасқан. Бұрынғы Кеңес Одағының 7 республикасы (Қырғызстан, Тәжікстан, Қазақстан, Әзірбайжан, Түрікменстан, Армения және Өзбекстан) дүние жүзінде адам бруцеллезі кең таралған 25 елдің қатарында болса, осы аймақтағы тағы бір ел - Моңғолия екінші орында тұр [2]. Соңғы жылдары бұл елдер дүние жүзінде адам бруцеллезінің ең қауіпті ошақтарына айналды. Осыған орай, бұл елдерде ауруды бақылауға ұлттық басымдылық беріліп отыр. Бруцеллез адам денсаулығына ғана қауіп төндірмей, сонымен қатар мал шаруашылығына үлкен зиян келтіруде [25]. Индетті жоюға бағытталған мал дәрігерлік қатаң шаралар мен шектеулер шаруашылықтарды айтарлықтай экономикалық шығынға алып келеді. Үй және жабайы жануарлардың инфекция ошақтары толығымен жойылған аймақтарда адам бруцеллезімен сырқаттанушылық айтарлықтай төмендегенін халықаралық зерттеулер растап отыр [26].

Бруцеллез қоздырғышы *Brucella* тұқымына жататын грамтеріс, капсуласыз және спорасыз, жасушаішілік, баяу өсетін коккобактериялар [1]. *Brucella* тұқымы *Brucellaceae* тұқымдасына, *Rhizobiales* отрядына, *Alphaproteobacteria* класына, *Proteobacteria* типіне жатады [27]. *Alphaproteobacteria* класының өкілдеріне сүтқоректілердің немесе өсімдіктердің патогендері немесе симбионты болып табылатын микроорганизмдер тұқымдасы жатады. *Alphaproteobacteria* класына сүтқоректілер үшін патогенді бактериялар болып табылатын *Bartonella*, *Rickettsia* және *Ehrlichia* тұқымдастары да енеді. Бұл микробтардың шағын геномдық мөлшері олардың облигатты жасушаішілік паразиттер болуына мүмкіндік береді. Бруцеллалардың *Rhizobiales* отрядының көптеген микроорганизмдерінен айырмашылығы - сүтқоректілердің жасушаларын зақымдай алуы. Мұндай қабілетті бруцеллалармен қатар тек *Bartonella* тұқымдасының бактериялары иеленген. Дегенмен, облигатты жасушаішілік қоздырғыш болып табылатын *Bartonella* мен факультативті жасушаішілік қоздырғыш *Brucella* spp. арасында айтарлықтай айырмашылықтар бар. Біріншіден, *Brucella* spp. геномы *Bartonella* spp. геномынан 50-100% үлкен және өсімдік қоздырғыштарына тән

метаболикалық функцияларды көбірек сақтаған. Бруцелланың топырақта ұзақ уақыт сақталуы (2 айдан астам) олардың өсімдік заттарын метаболиттік жолмен пайдалана алу қабілетін көрсетеді [28]. Бруцелланың бұл қасиетінің айқын мысалы ретінде топырақта *Brucella microti*-дің табылуын айтуға болады [29]. Бруцелла жасушаларының салыстырмалы түрде үлкен геномдық өлшемдері олардың әртүрлі орталарда бірнеше түрге жататын жануарлар организміндегі паразитизм жағдайларына бейімделу мүмкіндігін болжайды. Жануарлардың түріне байланысты бруцелланың жасуша қабырғасының құрылымдарында жеке өзгерістер орын алған. Мұндай өзгерістер қоректік заттардың сіңуінің және әртүрлі сүтқоректілердің жасушаларында қоздырғыштың жасушаішілік өсу және өнуінің ерекшеліктерімен түсіндіріледі. Инвазиялық қабілет *Bartonella* мен *Brucella*-ның жеке түрлеріне тән қасиет. Мүмкін, бұл қасиет прогениторлық жасушалардың нуклеотидтік құрамының өзгеруіне әкелген болуы мүмкін. Бұған дәлел - полисахаридтердің биосинтезін кодтайтын гендер, секреция жүйелері, адгезиндер және инвазиндер туралы мәліметтердің жариялануы [30]. Сүтқоректілердің жасушаларының инвазиясына қатысатын гендер прогениторлық жасушаларда болған және өсімдік қоздырғыштарында жоғалған деген болжам бар. Бұл жағдайда гендер арнайы нуклеотидтік құрамға ие болмайды, сондықтан бруцеллаларды анықтау үшін неғұрлым нақты тәсілдер қолданылады. *Brucella spp.*-ның бірнеше түрлерінің геномдарын бағалау нәтижелері жасушаішілік жағдайға бейімделу кезінде псевдогеннің түзілуі арқылы жекеленген бруцелла гендерінің қызметтерін жоғалтқанын көрсетті [31]. Кейбір авторлардың пікірінше, *Brucella spp.* үшін ерекше болып табылатын және қоздырғыштың вируленттілігін анықтайтын гендерінің көлденең тасымалдануы оның жасушаішілік тіршілікке бейімделумен байланысты [32]. Зооноздық емес патоген *Brucella ovis* геномындағы уреаз синтезіне қатысатын гендердің инактивациясы қоздырғыштың тропизмін және оның иесінің диапазонын тарылтады деген болжам жасалған [33]. Бруцелла түрлерінің шығу тегі туралы жорамалдар жануарлардың белгілі бір түрлеріне айқын бейімделуге бағытталған. Бруцелла түрлерінің таңдаулы иелерімен бірге эволюциясы олардың таңдамалы патогенділігіне негізделген айқын бастапқы нүкте болып табылады. Дегенмен, бұл қарапайым интерпретация жануарлар түрлері арасында байқалатын жалпы генетикалық вариацияға және бруцеллалар түрлері арасында байқалған шектеулі вариацияға сәйкес келмейді. Қожайын мен патоген міндетті түрде бірдей қарқынмен дами бермейтіні анық, бірақ белгілі бір жануар түріне бейімделген бруцеллалар түрлерінің арасында байқалған жалпы ұқсастық не шектеулі генетикалық икемділікті немесе кейінірек бейімделуді көрсетеді. Соңғы 86 000 – 296 000 жыл ішінде бруцелла түрлерінің көпшілігі ортақ түрден (мүмкін *B. ovis*) алшақтап кеткен деген қорытынды да жасалған [34]. Бұл ретте *B. abortus* және *B. melitensis* штамдары жеке кластерлерге топтастырылған, бірақ *B. canis* штамдары *B. suis* штамдарының тобына енген. Геномдардың көп реттілігі, 210 мың жылнамалық сегменттің транслокациясын қоспағанда, әртүрлі бруцеллалар түрлері арасында синтенияның жоғары дәрежесін анықтады. *B. suis* биоварында екі хромосома

анықталды, ал екіншісінің құрылымында көптеген қайта құрулар байқалған [35].

Бруцелланың филогеномикалық талдауы мен эволюциясы кейінірек 40 толық геном негізінде ұсынылды. Бұл жұмыста *B. canis* және *B. suis* штамдары да *B. ceti* және *B. pinnipedialis* штамдары сияқты бір генетикалық топқа кірді [36]. Ұқсас нәтижелер бруцелланың 18 штамының реттілігін салыстырмалы талдауда алынды [37]. Алынған деректер негізінде құрылған филогенетикалық ағаш жалпы түрде зерттелетін штамдардың түрге тиесілігін көрсетеді және 5 негізгі тармақты қамтиды: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* және *B. canis*, сонымен қатар *B. microti* және *B. pinnipedialis*. Тізбекті салыстыру бруцеллез қоздырғышының жеке штамдарының геномында бірегей локустардың болуын анықтады. Сондықтан *Brucella spp.* дивергенциясы бастапқы қожайындармен кең ауқымды коэволюцияның салдары емес, жануарлардың белгілі бір түрлерінің бейімделуін және ақырында таңдалуын көрсетеді [38]. Дегенмен, бруцелланың кейбір жануарлар түрлерін іріктеп жеңуінде қатандық жоқ екенін атап өткен жөн. Бруцелланың бір түрі жануарлардың бірнеше түрін жұқтыра алатындығы белгілі. Бұл қасиет тәжірибе жүзінде де, табиғи жағдайда да дәлелденген. Дегенмен, мұндай айқас инфекциялар кең таралған емес. Сонымен қатар, бір түрдің бруцелласы сиыр мен ешкі немесе сиыр мен шошқа малында жаппай түсік түсіретін жіті бруцеллезді тудырған. Мысалы, сиырлар мен жабайы шошқалардың жайылымдарда араласу нәтижесінде ірі қара малда *Brucella suis* қоздырған ауру байқалған. Сиырлардың сүтінен қоздырғыштың бөлініп алғанына қарамастан, аурудың жұқпалы қасиеті болмаған, өйткені бұл сиырлардан сау бұзаулар алынған [39]. Осылайша, бруцеллалардың өз қожайындарына бейімделу тұжырымдамасы одан әрі зерттеуді қажет ететін өзекті тақырып болып қала береді [31].

Бруцеллезбен ауырған жануарларда қоздырғыш тек несеппен, нәжіспен және басқа экскреттермен ғана емес, сонымен қатар инфекцияның таралуында негізгі рөл атқаратын сүтпен де беріледі. Табиғи жұғудың негізгі жолы – ластанған мал өнімдерімен тікелей байланыс. Бұл позиция векторлық беріліс жоқ екенін көрсететін эксперименттік деректерге сәйкес келеді [40]. Жабайы жануарларға, соның ішінде жыртқыштар мен кеміргіштерге инфекция өлекселер немесе ауру қоздырғышымен жұқтырылған басқа да органикалық заттармен берілуі мүмкін. Осылайша, бруцелланың көзі ретінде ауруға шалдыққан үй және жабайы жануарларын, сонымен қатар қоршаған орта нысандарын жатқызуға болады. Бруцелланы жақын тұқымдас бактериялармен салыстыру негізінде бұл қоздырғыш немесе оның прекурсоры жануарлар паразитіне айналған сапрофитті микроорганизм болған деген болжам жасалған. Бұл үрдістің нақты қадамдары белгісіз, бірақ қоздырғыштың эволюциясы кезінде белгілерді жоғалту, жаңа қасиеттерді иелену немесе олардың өзгеруі орын алып отырған. Осы өзгерістердің барлығы геномда көрінуі мүмкін болғандықтан, мүмкіндігінше көп геномдарды ретке келтіру және талдау маңызды [41,42]. Қазіргі уақытта талдау үшін 38 геномдық тізбектер қол жетімді. Тізбектелген геномдарды салыстыру ұқсас өлшемдерді, жалпы

нуклеотидтік құрамды және гендік синтениясын көрсетеді және т.б. бір хромосома тізбегінде бірнеше гендердің орналасуына байланысты. Геномдардың өздеріне тән ерекшеліктері олардың кейбір түрлерде екі хромосомаға бөлінуі болып табылады [43]. Бұл қасиет тұқымдастарға ортақ және мегаплазмиданы ұстау мен өзгертуді немесе бастапқы хромосоманың жеке бірліктерге бөлінуін қамтиды. Екі хромосома бір хромосомадан шыққан деген болжамды жақтаушы зерттеушілер дәлел ретінде құрамында бір хромосома бар *B. suis*-тің 3-ші биоварын келтіреді. Кіші хромосоманың плазмидтік шығу тегіне қарамастан, негізгі гендер екі хромосомада да орналасады және олардың екі хромосома арасында таралуы тізбектелген түрлерінде ұқсас. Екінші хромосоманың плазмидтік шығу тегі бір-бірімен тығыз байланысты түрлердің геномдарында да расталады, оларда сызықтық плазмидалар мен мегаплазмидалар гендердің ұқсас орналасуын көрсетеді. Бруцеллалардың түрлерінің геномдарында гуанин-цитозиннің (GC) бірдей мөлшері, кодтау аймақтарының ұқсас үлесі және хромосомалар арасындағы гендердің эквивалентті таралуы анықталды. Көптеген транспозондар, кірістіру элементтері және фаг қалдықтары олардың эволюциясына белсенді үлесін қосқандығын дәлелдейді. *B. suis* көптеген қосымша метаболикалық функцияларды, соның ішінде өсімдік тектес қоректік заттарды пайдалануды және сол сияқты басқа да пайдалы белгілерді иеленген. Эволюциялық дивергенцияға және/немесе иесіне бейімделуге қарамастан, бруцелланың вируленттілігінің факторлары тұқымда айтарлықтай өзгерістерге ұшырамаған. Вируленттіліктің және иесінің ерекшелігінің өзгеруіне әкеле алатын фаг-делдалдық факторлардың, сондай-ақ кейбір гендердің енгізілу және жойылу мүмкіндіктері туралы бірнеше мысалдар бар, бірақ олардың вируленттілікке қосқан үлесі қосымша зерттеулерді қажет етеді [44].

Бруцелланың таксономиясы мен номенклатурасы тұқым ішіндегі түрлер мен түр тармақтарын анықтау мақсатында қолданылатын кең ауқымды фенотиптер мен генетикалық әртүрліліктер зерттеушілер арасында үлкен қызығушылық тудырып отыр [45]. XIX ғасырдың соңы мен XX ғасырдың басында зерттеле бастаған *Brucella* тұқымдасына жататын бактериялардың әрқайсысы белгілі бір жануардың созылмалы инфекциясын тудыра алатындығы белгілі болды. *Brucella melitensis*-ті 1887 жылы David Bruce Мальтада орналасқан британдық әскери бөлімше әскерлерінің арасында пайда болған жұқпалы аурудың себебі ретінде анықтады [46]. Дегенмен, Themistocles Zammit өз еңбегінде *B. melitensis* адамға ешкі сүтін пайдалану кезінде жұғатындығын алғашқы рет дәлелдеп берген болатын [47]. Келесі онжылдықтарда бруцелланың басқа түрлері сиырға (*B. abortus*) [48], шошқаға (*B. suis*) [49] итке (*B. canis*) [50], қойға (*B. ovis*) [51] және егеуқұйрықтарға (*B. neotomae*) қауіпті екендігі расталды [52].

Brucella-ның адам үшін қауіптілігі олардың түрлеріне байланысты болып келеді. Жалпы алғанда, олардың бәрі адамды ауруға шалдықтыра алады, сондықтан да бруцеллалар биологиялық қауіптіліктің үшінші класына жатқызылған. Дегенмен, *Brucella* тұқымдасы өкілдерінің адамда тудыратын

ауруы әртүрлі ағымда өтеді. Мысалы, олардың ішінде *B. abortus*, *B. melitensis* және *B. suis* адам денсаулығына аса қауіпті болып саналады, ал *B. ovis*, *B. neotomae* және *B. canis* сияқты басқа түрлері бұл санатқа енбейді.

XX ғасырдан бастап бруцеллездің диагностикасы мен эпидемиологиялық бақылауын жақсарту үшін түрлерді сәйкестендіруді растау үшін фенотиптік талдау жүйесі әзірленіп, пайдалана бастады [53]. Бұл жүйе бірқатар фенотиптік қасиеттерге негізделген: әртүрлі микробиологиялық бояғыштарды қолдану, антибиотиктер және метаболикалық субстраттарды қолдану; бруцеллалардың бактериофагтарға бейімділігін зерттеу, антиденелермен агглютинацияға тартылу және т.б. Фенотиптік айырмашылықтар эпидемиологиялық бақылау нәтижелерін қолдана отыра инфекция көзін тиімді анықтау үшін пайдаланылды [54]. Бұл жүйе құнды болып шықты, бірақ молекулалық биология әдістерінің пайда болуы сәйкестендіру стратегияларын жақсартуға жаңа мүмкіндіктерді ашып берді. Алайда, бастапқы перспективалы болжамдарға қарамастан, молекулалық әдістер бруцеллездің диагностикасын жақсартып алмады. Ең алғашқы молекулярлық деректер ДНҚ гомологиясы 95%-дан асатын қолжетімді әдістерді қолдану арқылы түрлер мен биоварларды ажыратуға болмайтынын көрсетті [55]. Геном архитектурасын, 16S рибосомалық РНҚ және сыртқы мембрана ақуыздарын қоса алғанда, тұрақты және потенциалды айнымалы ген функцияларын, сондай-ақ көп локусты тандемді қайталау тізбегін бағалауда *Brucella* тұқымына жататын түрлердің бір-бірімен алшақтығы шамалы екенін көрсетті. 1980 жылдардың аяғында *Brucella*-ның белгілі бір жануарлар түрлеріне патогенділігімен ерекшеленетін алты биовардан тұратын *Brucella melitensis*-тің моноспецификалық тұқымдасы екендігі туралы идея тұжырымдалған болатын [56]. Дегенмен, жаңа таксономия бірауыздан қабылданбады [57, 58].

Бруцеллалар түрлеріне қолданылатын геномдық секвенирлеудің пайда болуы олардың генетикалық дивергенциясының сипатын зерттеуге мүмкіндік беріп отыр. Бүкіл геном бойынша қайталанулардың айнымалы саны бар тандемді қайталау реті қайталанулар арасындағы және олардың ішіндегі рекомбинацияға байланысты гиперөзгермелілікті қамтамасыз етеді, бұл басқада реттіліктерде қарастырылмаған. Тандем қайталануларының айнымалы саны бар мультилокусты талдау ең жиі қолданылатын әдіс болып табылады және түрлер арасындағы нақты айырмашылықты да, түр ішіндегі биоварлардың генетикалық ара-қатынастарын да растай алады [59]. Дегенмен, бұл тәсілдің тағы бір артықшылығы - географиялық вариацияны анықтай алатындығы. Мультилокусты реттілік филогенетикалық зерттеулерде және жаһандық эпидемиологияда өзінің құндылығын көрсетті [45]. Бұл тәсіл бейтарап алмастырулармен баяу эволюциядан өткен тұрақты гендердің комбинациясынан алынған ДНҚ тізбегін пайдаланады. Бірнеше локустарды пайдалану тиімді болып отыр, өйткені ол бір генетикалық локуста орын алуы мүмкін кездейсоқ өзгерістерге байланысты бұрмаланған нәтижелерден қорғайды, сонымен бірге сол консервативті локустарда болған өзгерістердің тарихи жазбасын сақтай алады.

Бұл тәсіл бастапқы да анықталған төрт түрдің (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis* және *B. neotomae*) бактерияларының жеке кластерлерін немесе топтарын анықтауға мүмкіндік берді. *B. suis* изоляттары әртүрлі кластерлерге еніп отыр, ал *B. suis*-тің 5-ші биовары басқалардан айқын ерекшеленіп, теңіз сүтқоректілерінің изоляттарымен тығыз байланыста екендігін көрсетті. Басқа типтеу схемаларын, соның ішінде фенотиптік талдауды қолданудың нәтижелері *B. canis* сияқты *B. suis*-тің 3-ші және 4-ші биоварлары 1 биовардан шыққанын көрсетеді. Осылайша, молекулалық биология әдістері бізге бруцеллалардың шығу тарихы туралы жаңа деректер алуға мүмкіндік береді және бұл тұқымдастың эволюциясы мен қоздырғыштың вируленттілігін және оның белгілі бір қожайынға бейімделуін бағалау үшін құнды құрал болып табылады. Диагностикалық мүмкіндіктердің жетілуі, сезімталдығы мен телімділігі жоғары анықтау әдістерінің пайда болуы бруцелланың жаңа түрлерін анықтауға мүмкіндік туғызды. Айталық, дельфиндер [60] мен итбалықтардан [61] алынған изоляттар идентификацияланды. Олар *B. neotomae* және *B. suis*-тің 5-ші биоварымен топтасатын 3 ерекше генетикалық тұқымға жатқызылды [62]. Кейінірек, тышқандардан, түлкілерден, ең соңында топырақтан бруцеллалардың тағы бір түрі - *B. microti* бөлініп алынды [63]. ДНҚ тізбегін талдау және гендерді салыстыру бұл қоздырғыштың *B. suis*-пен тығыз байланысы бар жеке түр екенін көрсетті. Дегенмен, көптеген фенотиптік айырмашылықтар бұл екі бруцелланың түрін бір-бірінен ажыратып, олардың жақын ДНҚ гомологиясын жоққа шығарып отыр [41]. *Brucella inopinata* BO1-ді кеуде имплантантынан және BO2-ні адамның өкпесінен бөліп алу *Brucella spp.* арасында 16S рибосомалық ДНҚ тізбегіндегі дивергенцияны кеңейте түсті [64].

Тұрақты гендік тізбектердің гомологиясын әрі қарай егжей-тегжейлі зерттеулер бруцеллалар мен *Ochrobactrum* тұқымдасына жататын бактериялардың өзара ұқсас ішкі, аралық тізбегінің бар екендігін анықтап, бұл екі топтың генетикалық байланысын дәлелдеді [45]. Бруцелланың номенклатурасы мен таксономиясы жөніндегі комитеттің қызметі бруцеллалар тұқымдасына қатысты қолда бар ақпаратты жинауға және кодексте қамтылған ережелер мен ережелерді пайдалана отыра, халықаралық стандартқа сәйкес тұрақты және шатасуды болдырмайтын қатаң жіктеу схемасын сақтауға бағытталған. Кодекске сәйкес дәлдікті сақтау және зерттеуді жалғастыру үшін жаңа ақпараттың бруцеллалардың ағымдағы таксономиялық схемасына ықтимал әсерін анықтау керек [45]. Испанияның Памплона қаласында (2003) өткен бруцеллаларды зерттеу бойынша халықаралық конференцияға қатысушылардың көпшілігінің пікірі бойынша түрді моноспецификалық тұқымдас ретінде белгілеу - қызметкерлердің қауіпсіздігіне қауіп төндіретінін жағдай. Дегенмен, бұл форумда полиспецификалық тұқымдасқа қайта оралу туралы да ұсыныстар айтылған болатын. Айталық, бруцеллаларды *Ochrobactrum* тұқымдасына қайта жіктеу де ұсынылды. Алайда, бұл ұсынысқа көпшілік қарсылық білдірілді. Қарсыластар негіз ретінде, ең алдымен, *Ochrobactrum spp.* BSL2 деңгейінен жоғары емес эксперименттік жағдайларды қажет ететін шартты-патогенді қоздырғыштар екендігін алға тартты. Ал,

Brucella spp. болса BSL3 қоздырғыштары қатарына жатады және олармен жұмыс істеу арнайы дайындықты қажет етеді. Мұндай өзгерістердің нормативтік сәйкестікті зерттеуге айтарлықтай кедергі келтіретіндігі және клиникалық, ветеринарлық немесе бруцеллаларды зерттеу қауымдастығы тарапынан қолдау таппайтындығы баса айтылды. Дегенмен, практикалық қолайлыққа қарамастан, бруцеллалардың таксономиясын жетілдіруге бағытталған ғылыми жұмыстар жүргізіле беруі керек. Болашақта бруцеллалардың таксономиясына енгізілетін түбегейлі өзгерістер іргелі зерттеулердің нәтижесіне сүйеніп, қатаң негізделуі керек [38].

Бруцелла түрлерінің арасында айтарлықтай айырмашылықтар бар екені анық. Бұл айырмашылықтар басқа патогендердің түрлерінің арасында байқалатын белгілермен салыстырғанда шағын болып көрінгенімен, бруцеллалардың түрлерін бір-бірінен ажыратуға мүмкіндік береді. Қоршаған ортада төзімділік қабілетіне ие болғанымен, бруцеллалардың әр түрі өздеріне қолайлы қожайындары таңдаған. Бұл жақын қарым-қатынас уақыт өте бейімделу өзгерістеріне әкелген сияқты. Бұл өзгерістерді анықтау инвазияға, тұрақтылыққа, тасымалдануға және тіпті вируленттілікке ықпал ететін маңызды өзара әрекеттесулерді анықтау үшін пайдаланылуы мүмкін және салыстырмалы геномиканың неғұрлым толық қажеттілігін көрсетеді. Бұл организмдердің өздерінің таңдаулы иелерімен бірге эволюциясы көп жағдайда қарапайым заңдылықпен жүрмейді, сондықтан бейімделу немесе түрлену тез және салыстырмалы түрде жақында болған сияқты. Жалпы алғанда, бруцеллалар таксономиясындағы елеулі өзгерістерді қарастырмас бұрын бруцелла геномдарына арналған ғылыми жұмыстарды бір жүйеге келтіріп алу керек. Қазіргі кезде бруцеллалардың неғұрлым қатаң және заманауи жіктеу схемасын қамтамасыз ететін және жаңа түрлерді белгілеудің ең төменгі стандарттарын көрсете алатын ұсыныстарды енгізу жоспарлануда. Осыған орай, микроорганизмдердің таксономиядағы орынын дұрыс анықтау арқылы қауіпсіздікті жақсарту, номенклатурадағы қажетсіз және жаңылыстыратын өзгерістерді болдырмау, түрлердің бейімделуін, эволюциясын, қожайын мен патогеннің өзара әрекеттесуін және вируленттілігін түсіндіре алатын ғылыми зерттеулер керек-ақ. Классикалық номенклатураға қайта оралу заманауи нәтижелерді сынау ретінде емес, керісінше, зерттеу қауымдастығының шектеулерді, түсінбеушіліктерді және тіпті жаңа белгілермен байланысты қауіптерді мойындауы ретінде қарастырылуы керек [38].

Қорыта айтқанда, *Brucella* бактерияларының түрлерін дифференциациялау олардың морфокультуралық және метаболикалық ерекшеліктерінің айқын біртектілігіне байланысты оңай жұмыс емес. Бруцеллездің зертханалық диагностикасын жетілдірудің ең перспективалы бағыттарына патоген геномының түр-спецификалық фрагменттерін анықтауды және молекулалық-генетикалық технологияларды жатқызуға болады. Молекулалық-генетикалық әдістерді қолдану арқылы бруцеллаларды анықтаудағы белгілі қиындықтар олардың жоғары деңгейдегі генетикалық гомологиясымен байланысты болып отыр. Бруцелланың барлық түрлері

геномдық құрылымның ұқсастығын және ДНҚ сәйкестігінің жоғары пайызын көрсетіп отыр. Қазіргі кездегі белгілі бруцелла түрлерінің арасында *B. melitensis* пен *B. abortus*, ал *B. suis* пен *B. canis* өзара ең жақын генетикалық байланыста екендігі анықталды. Бруцеллалар түрлері арасындағы геномдық айырмашылықтар бірегей түрлердің инсерцияларымен, ДНҚ фрагменттерінің делециясымен және псевдогендердің орналасуымен байланысты. Қорыта айтқанда, транскриптомиялық талдаудың заманауи технологияларын қолдану бруцеллез қоздырғышының биологиясын және жұқпалы үрдісті зерттеудің сапалы жаңа деңгейіне жол ашып отыр. Бруцелланың негізгі патогендік гендерінің қызметін білу жануарлардың бруцеллезін диагностикалау мен алдын алудың тиімді тәсілдерін әзірлеуге ғылыми негіз бола алады.

1.2 Бруцеллез қоздырғышының антигендік құрылымы және оның диагностикалық маңызы.

Бруцеллездің қоздырғышы II-ші патогендік топтағы микроорганизмдерге жатады. Қоздырғыштың табиғи резервуары және инфекция көзі болып үй және, сирек болса да, жабайы жануарлар болып табылады. Бруцеллалар сырты орта жағдайларына және қожайын организмнен тыс жағдайларға да төзімді болып келеді. Сонымен қатар, бруцеллалар жоғары жұғымталдығымен және зақымданбаған шырышты қабаттар арқылы да ағзаға ену қабілетімен сипатталады. Бруцеллалар гемотоксикалық қасиетті иеленген жасушаішілік паразиттер болып табылады. Олар негізінен мононуклеарлы-макрофагтар жүйесінің жасушаларында (моноциттерде, ұлпа макрофагтарында, дендритті жасушаларда) сақталады, сонымен қатар басқа да жасушаларда (трофобластарда, фибробласттарда, эритроциттерде), тіпті жасушадан тыс жерлерде де кездеседі.

Барлық түрлердің бруцеллалары морфологиялық жағынан бір-біріне өте ұқсас болып келеді – грам теріс, аэробты/микроаэрофильді, өте ұсақ ($0,5-0,7 \times 0,6-1,5$ мкм), капсуласы жоқ, факультативті, жасуша ішінде тоғышарлық ететін коккобактериялар. Бруцеллалар спора түзе алмайтын, қозғалтқыш жіпшелері жоқ, барлық анилиндік бояулармен бояла алатын бактериялар. Бруцеллалардың түрін және инфекция көздерін (резервуарларын) анықтау, ауру қоздырғышының бір жануар түрінен екіншісіне көшу фактілерін тіркеу (әсіресе сиыр малына *B. melitensis*-тің ауысуы өте қауіпті) эпидемиологиялық және эпизоотологиялық тұрғыдан алғанда аса маңызды болып табылады.

Бруцелла түрлерін бір-бірінен ажырату олардың морфо-культуралды және метаболикалық ерекшеліктерінің айқын біртектілігіне байланысты айтарлықтай қиын. Басқа грам теріс бактериялар сияқты, бруцелланың жасуша қабырғасы ішкі цитоплазмалық мембранадан тұрады, ол сыртқы мембранамен байланысқан пептидогликан қабатымен қоршалған. Бруцеллалардың сыртқы мембранасы фосфолипидтер мен липополисахаридтерден және мембраналық ақуыздардан тұратын кешен. Бруцелланың пептидогликаны басқа грам теріс бактериялардікімен ұқсас және оның құрамына глюкозамин, мурам қышқылы, аланин, глутамин қышқылы, диаминопимел қышқылы кіреді [66]. Бруцелланың ЛПС-ді – 3 негізгі құрылымы бар күрделі амфипатикалық биополимер:

Алипиді, олигосахаридтер өзегі және О-антигені (О-бүйірлік тізбек). Бруцелланың тегіс типті О-полисахариді (S-ЛПС) – 1,2-байланыстырылған 4,6-дидеокси-4-формамидо- α -D-маннопираносилдің сызықты гомополимері. О-полисахарид манноза, глюкоза, 2-амино-2,6-дидезокси-D-глюкоза (хиновосамин), 2-амино-2-дезокси-D-глюкоза (глюкозамин) және басқа да анықталмаған қанттардан тұратын негізгі олигосахаридпен байланысқан. Орталық олигосахаридпен байланысқан А липидінің құрамында негізгі тізбек ретінде ұзын тізбекті амид пен эфир байланыстарымен және гидроксилденген май қышқылдарымен қаныққан диамин глюкозасы бар. Гидрофобты А липиді негізінен мембрананың сыртқы жабынын құрайды және ЛПС-ке тән көптеген эндотоксиктік қасиеттерге жауапты. *Brucella spp.* А липиді сыртқы мембрана ақуызының фрагменттерімен тығыз байланысқан. Дәл осы ЛПС бөлігі грамтеріс микроорганизмдердің вирулентті, антигендік қасиеттерін анықтайды. S-формалы ЛПС-тің ұзын полисахаридті тізбектері қожайынның иммунологиялық жауаптарына қарсы тұра алатын қорғаныс факторлары болып табылады. Бұл құрылым бруцеллалардың қожайынының денесінде ұзақ мерзім сақталуына жағдай жасайды [67].

Brucella тұқымдасына жататын бактериялардың S-липополисахаридті антигенін (О-антигенін) анықтау қосымша критерийлердің бірі болып табылады [68]. *Brucella*-ның S-ЛПС-нің О-бүйірлік тізбегінің құрылымы ауру қоздырғышының бір түрін басқаларынан ажыратуға мүмкіндік береді. Бруцеллалардың О-антигенінің ішек бактерияларының S-ЛПС-тен айырмашылығы - құрамында гектозаның болмауы [69,70]. *Brucella* S-ЛПС-тері бактерия жасушасын фагоциттердің микробқа қарсы белсенділігін қамтамасыз ететін факторлардың зиянды әсерінен қорғауға көмектеседі (катионды ақуыздар, пероксидаза, реактивті оттегінің түрлері), ал қоздырғыштың жалпы соматикалық антигені қожайынның протеолитикалық ферменттерінің каскадтық жүйесін (комплеммент жүйесі) тежейді, сыртқы мембрананың құрамында орнитині бар липидтер мен липопротеидтер жасушаны табиғи төзімділік факторларынан қорғайды [71]. S-липополисахаридтердің молекулаларының құрамында бруцелланың А- және М-антигендік эпитоптары орналасқан. Бұл антигендердің мөлшерлерінің ара қатынасы бруцеллалардың биоварларына байланысты болып келеді. Осының негізінде штамдарды үш топтың біріне жатқызуға болады: А+ М-, А- М+ және А+ М+ [72]. Бруцелланың А- және М-антигендері құрылымдық жағынан ұқсас болып шықты: А-антигені 1,2-көміртекті байланыс арқылы 4-формамидо-4,6-дидеокси- α -D-маннопиранозаның 96-100 қалдықтарынан тұратын сызықты О-гомополимер, ал М-антигені бұл қалдықтармен 1,3-көміртекті байланыс арқылы жалғасқан [73].

S-формадағы бруцеллалар мен *Escherichia coli* 0:116 и 0:1570:116 және 0:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella* тобы (0:30), *Pseudomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* 0:9 араларындағы кроссерологиялық реакциялар аталмыш микроорганизмдердің S-ЛПС-нің О-тізбектерінде құрамы бірдей 4-формамидо-4,6-дидеокси- α -D-маннопираноза қалдықтарының

болуымен түсіндіріледі [74]. Осыған байланысты бруцеллезге тән липополисахаридті емес антигендерді айқындау бруцеллез диагностикасы ғана емес, сонымен вакцинологиясы саласында жүргізіліп жатқан зерттеулердің маңызды міндеттерінің біріне айналды. Бастапқы зерттеулер *B. abortus* 1119-3 және *B. abortus* 2308 жасушаларында тиісінше 6 және 18 иммунды-доминантты ақуыздарды анықтады. A.Dahouk et al. (2006) бруцеллездің серодиагностикада қолдануға болатын *B. abortus* 1119-3-тің жаңа ақуыздық антигендерін анықтады [75]. Авторлар аталмыш штамның бүтін жасуша үлгілеріндегі иммунодоминантты жолақтарды анықтау үшін гипериммунды қоян сарысуын 2-DE және вестерн-блоттинг талдауларында қолданды. Нәтижелерге сүйенсек, мына келесі ақуыздар: Cu-Zn-СОД, BCSP31, рибосомалық ақуыз L7/L12, GroEL, GroES және DnaK антигенділік қасиеттерін көрсетті. Ұқсас тәсілдерді қолдана отыра, Connolly et al. [76] адам мен ірі қара малдың бруцеллез инфекциясына қарсы вакцина жасау үшін үміткер ақуыздарды анықтады. Бұл үшін олар алдымен 2-DE MALDI-TOF MS және LC-MS/MS көмегімен *B. abortus* 2308 жасуша қабырғасында 163 ақуызды анықтады. Бруцеллезбен жұқтырылған сиыр мен ауру адамның антиқансарысуларын 2-DE және иммуноблоттингте қолдана отыра, авторлар бруцелла жасушасында фумаратредуктазаның флавопротеинді суббірлігін, F0F1 АТФ-синтазасының альфа суббірлігін және цистеинсинтаза сияқты бірнеше жаңа иммуногенді ақуыздарды анықтады. Кейінірек *B. melitensis*-тің иммуногенді ақуыздарының алғашқы профильдері алынды. Айталық, *B. melitensis* M5 жасушаларынан және оның мембраналық ақуыздарынан вестерн блоттингті қолдану арқылы 61 ақуыз анықталды [77]. Элонгация факторы G, АТР синтазасының F0F1 бета суббірлігі және СМА1 сияқты көптеген ақуыздар алғашқы рет бруцеллалардың иммунореактивті ақуыздары ретінде анықталды және вакцина дайындауға жарамды үміткерлер ретінде сипатталды. Басқа бір зерттеулерде бруцеллезге қарсы суббірлік вакцинаны әзірлеуге жарамды 11 иммуногенді ақуызды иммунопротеомды тәсілді қолдана *B. melitensis* 16М-ның протеомынан тапқан [78]. 2012 ж. басқа зерттеушілер иммунопротеомиканы *B. abortus* S19-дың антигендік ақуыздарын анықтау құралы ретінде пайдаланған және бұл ақуыздардың постинфекциялық антиденелерді поствакцинациялық антиденелерден тиімді ажыратуға мүмкіндік беретіндігін жазған [79]. Басқа бір жұмыста табиғи жолмен жұқтырылған сиыр малының антиденелеріне антигенділік қасиет көрсеткен *B. abortus* S19-дың 5 протеині (инвазиялық ақуыз В, СОД, Dps, Ndk және Vfr) анықталған. *B. abortus* 544-пен жұқтырылған тышқандардан инфекцияның бастапқы, ортаңғы және соңғы кезеңінде алынған қансарысуларын иммуноблоттингте қолдану қоздырғыштың құрамында 17 иммунодоминантты ақуыздың бар екендігін анықтады [80].

О-полисахариді жоқ *B. abortus* RB51 мутантты жасушасының құрамындағы (R-штамм) антигенді ақуызды иммунопротеомика әдісімен анықтау үшін бруцеллезбен жұқтырылған сиыр сарысуының антиденелері иммуноблоттингте қолданылған [81]. Зерттеу барысында жасуша құрамында 11 иммунореактивті ақуыз, атап айтсақ Cu/Zn-СОД, DnaK шаперонин, GroES

шаперонин, жасуша бөлінуінің FtsZ протеині, 50s L10 рибосомалық ақуыз және инвазия В протеині табылды. Бұл ақуыздар бруцеллез серодиагностикасында айқыш реактивтілікті төмендетуге пайдалы болуы мүмкін деген қорытынды жасалынды. Жақында *B. melitensis* және *B. abortus* далалық штаммдарының бүтін жасушалық иммунореактивті ақуыздары табиғи түрде жұқтырылған күйіс қайыратын жануарлардың сарысуларының көмегімен 1D және 2-DE иммуноблоттинг тәсілдерімен талданды [82]. Зерттеушілер *B. abortus*- және *B. melitensis* қоздырғыштарына қарсы бағытталған телімді антиденелерді анықтау мақсатында жасушалар құрамындағы 52 иммунды-доминантты ақуыздар балама серологиялық сынақтарды әзірлеуде пайдалы болуы мүмкін деген тұжырымға келген.

Кейінгі кезде бруцелланың ақуыздық құрамдас бөліктерінің ішінде экзопротеомдар деп аталатын ақуыздар ерекше маңызға ие бола бастады. Экзопротеома—биологиялық жүйенің жасушасынан тыс орналасқан ақуыздар кешені. Бұл ақуыздар жасушадан тыс ортаға белсенді түрде бөлінеді немесе жасуша лизисі мен ақуыздың ыдырауының жанама өнімі болып табылады. Экзопротеомдағы ақуыздар, атап айтсақ тасымалдаушылар, протеазалар, токсиндер және сенсорлар сияқты бактериялардың беткейіндегі ақуыздарымен бірге қоршаған ортамен, соның ішінде бруцелла қожайынының жасушасымен әрекеттесу үшін өте маңызды [83]. Бөлінген ақуыздар мембрана мен жасуша қабырғасының биогенезінде, патогенезінде, қоректік заттардың сіңірілуінде және патогеннің қозғалғыштығында маңызды рөл атқарады. Сыртқы мембрана везикуласының (СМВ) ішінде ақуыздардың ерекше бір түрлері кездеседі. СМВ-бактериялардың беткі антигендерін, шағын метаболиттерін, нуклеин қышқылдарын және ақуыздарды тасымалдайтын бактериялар бөліп шығаратын наноөлшемді құрылымдар. Бұл везикулалардың патогеннің вируленттілік факторларын - протеазалар мен токсиндерді шығаруға, сигнал беру, ДНК транслокациясы және иммуномодуляцияға қатысатындығы дәлелденген [84]. Бруцеллалар ЛПС, сыртқы мембрана ақуыздары және басқа бактериялық компоненттері бар СМВ-ді тіршілік өнімдері ретінде шығарып тұрады [85]. Зерттеулер көрсеткендей, СМВ адам моноциттері арқылы *B. abortus* интернационализациясына ықпал етеді және иммундық жауапты тежейді, сонымен қатар қоздырғыштың қожайын организміндегі персистенциясына жағдай туғызады [86]. *B. melitensis*-тің СМВ-ын протеомикалық зерттеулер нәтижелері оның құрамында СМА16, СМА19, СМА25 және СМА31 сыртқы мембраналық ақуыздардың, сондай-ақ СОД және GroES сияқты басқа иммуногенді құрылымдардың бар екендігін көрсетті [87]. Сонымен қатар, зерттеулер СМВ-ның қожайынның иммундық реакциясын ынталандыратын қабілеті бар екендігін көрсетті.

VirB секреция жүйесі бруцелланың вируленттілігінің негізгі детерминанты болып табылады, ал IV типті секреция жүйелері (T4SS) тірі қалуға және жасушаішілік репликацияға жәрдемдесу үшін қожайын жасушасының функцияларын модуляциялайтын эффекторлық ақуыздарды жасушаішілік жеткізуге қатысады. Салыстырмалы протеомаға негізделген

әдістер VirB субстраттары мен осы секреция жүйесінің экспрессиясы мен белсенділігіне әсер ететін ақуыздарды анықтау үшін пайдаланылды. Бірінші зерттеу жоғары белсендірілген VirB жүйесі әсер ететін ақуыздарды анықтауға бағытталды [88]. Бұл жұмыс *B. melitensis*-тің жабайы түрі мен virB мутантының протеомаларын салыстыру арқылы жүргізілді. MALDI-TOF-MS талдауының көмегімен аминқышқылдарының тасымалдануы мен метаболизмі, липидтер алмасуы, энергия өндірісі, жасуша мембранасының биогенезі, трансляция, трансляциядан кейінгі модификациялар, ақуыз алмасуы және басқа функционалдық топтарға қатысатын ақуыздар анықталды. Жасушаішілік тоғышарлыққа қатысатын вируленттілікке байланысты бірнеше ақуыздардың, айталық VjbR, DnaK, HtrA, OMP25 және GntR-дердің белсенділігі virB мутантында біршама төмендетілді. Вегетативті өсу кезінде қоректік ортаға ақуыздардың бөлінуіндегі VirB рөлін анықтау мақсатында да зерттеулер жүргізілген болатын [87]. Авторлар *B. abortus* 2308 жабайы типті (WT) және оның изогендік virB10 мутантының жасушадан тыс ақуыздары бар өсінді (культура) үстемелерін (супернатанттарын) жинап алып, оларға 2-DE көмегімен талдау жасады. WT штаммында кездесетін, ал virB10 мутантында болмайтын дифференциалды ақуыз дақтары virB-тәуелді түрде бөлінетін жасушадан тыс ақуыздар болып шықты және олар MALDI-TOF талдауымен айқындалды. Барлығы 11 түрлі ақуыздар анықталынды, олардың ішінде DnaK, холойлглицингидролаза және пептидилпролил цистрансизомеразасы да табылды. VirB жүйесінің сыртқы мембрана құрамына әсерін бағалау үшін жабайы типті *B. melitensis*-тің және virB мутантының протеомдары бөліп алынып, салыстырылған [90]. Барлығы 45 дифференциалды ақуыздар анықталған, олардың көпшілігі сыртқы мембраналық ақуыздары (pCMA25/31) болып шықты. Соңғы бір зерттеулерде, VirB өндіретін, бірақ онымен сыртқа бөлінбейтін ақуыздарды анықтау үшін жабайы типті *B. abortus*-тың және virB-дің мутантты протеомалары өзара салыстырылған [91]. 2-DE және MALDI-TOF/TOF MS талдауынан кейін 69 дифференциалды ақуыз анықталған. Олардың көпшілігі әртүрлі функционалдық категорияларға жататын сыртқы мембраналық және периплазмалық ақуыздар болып шықты. Басқа бір жұмыста қоректіктік ортаға бөлінген *B. abortus* ақуыздары 2-DE және MALDI-TOF/TOF талдаулары арқылы зерттелген. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, бруцелланың бұл түрі CuZn-COD, pCMA, GroEL және DnaK сияқты 27-ден астам ақуызды синтездей алған. Тышқандарды бруцеллалардың өсінділерінің супернатантындағы ақуыздармен иммундеу күшті гуморальды және жасушалық иммундық жауапты тудырған және *B. abortus*-пен тәжірибелік жұқтыру кезінде жақсы протективті қасиеттерін көрсеткен [92].

Бруцелланың негізгі pCMA-дары алғаш рет 1980 жылдары бактерия жасушасының қабырғасынан детергенттермен экстракциялау арқылы бөлініп алынған болатын. Натрий додецилсульфатының қатысуымен жүргізілген ПААГ электрофорезінде pCMA өздерінің молекулалық салмақтарының негізінде 3 топқа жіктелген:

- 1 топ – молекулалық салмағы 36-38 кДа арасындығы пориндер – бұл В-лимфоциттерге қатысты митогендік қасиеті бар мембраналық ақуыздар;

- 2 топ – молекулалық салмағы 25-27 кДа болатын, құрамында көмірсутектері бар ақуыздар. Жасушада олар ди- немесе тримерлер түрінде болады;

- 3 топ - пептидогликанмен ковалентті байланысқан липопротеиндер.

1-ші және 2-ші топтың сыртқы мембрана ақуыздары негізінен *E. coli*-дің OmpF және OmpA ақуыздарына, ал бруцелла липопротеидтері *E. coli* липопротеидтеріне ұқсас. 2-ші топтың ақуыздары антигендік қасиеттері бойынша әр түрге жататын бруцеллаларда ұқсас болып келеді [93].

Кейінгі зерттеулер лизоциммен алдын ала өңделген *B. abortus* 99 пептидогликанының құрамында ПААГ-ДСН электрофорезінде молекулалық салмақтары 37 кДа, 25 кДа және 15 кДа болатын 3 ақуызды айқындаған [94]. Олардың біріншісі мен екіншісі бірнеше ұсақ ақуыз дақтарынан құралған болып шықты. Айталық, бірінші жолақ молекулалық салмақтары 40 кДа, 38 кДа, 37 кДа және 34 кДа, ал екінші жолақ молекулалық салмақтары 27 кДа, 26 кДа, 26 кДа және 23 кДа болатын қосалқы дақтардан құралған болды. Карбоцианинмен бояған кезде бірінші жолақ қызыл түске боялды, бұл оның ақуыздық табиғатын көрсетеді, екіншісі гликопротеидтерге тән көк түсті қабылдады, ал үшіншісі – сары түске боялып, ақуыздардың құрамында липидтердің бар екендігін көрсетті. Кейінірек аталмыш бруцелла штаммының жасуша қабырғасынан молекулалық салмағы 43 кДа болатын ақуыз бөлініп алынды [95].

Verstrate D.R. et al. [96] *B. abortus* 19, 2308, 45/00 және С-10 штамдарынан бөлініп алынған ақуыздардың үш тобына сипаттама берді. Бруцелланың жасуша қабырғасы N-лаурил саркозинатымен және диполярлы ионды детергентпен экстракцияланып, әрі қарай лизоциммен өңделінді. СДН-ПААГ электрофорезінде бруцелла препараттарының үлгілері молекулалық салмақтары 94 кДа, 41-43 кДа және 30 кДа болатын 3 топқа жіктелінді. Хроматография арқылы тазартылған екінші топтың ақуыздары жоғары температураға төзімділік көрсетті және аминқышқылдарының құрамы бойынша *E. Coli* OmpF ақуызына ұқсас болды. Үшінші топтың ақуыздары қыздыруға дейін және одан кейін электрофорез кезінде миграция жылдамдығын өзгерткен жоқ, бірақ олардың аминқышқылдық құрамы *E.coli* OmpA ақуызына ұқсас болды.

B. abortus 1119-3, 45/20 және *B. melitensis* 115 ақуыздары мен ЛПС-тері *E. coli*-дің аттас компоненттерімен салыстырғанда иондық емес детергенттермен экстракциялауға төзімді болды [97]. Мысалы, ЭДТА және лизоциммен бруцеллаларды өңдеу кезінде сферопластар түзілмеді, бұл жағдай авторлардың бруцелла мембранасының ақуыздары мен ЛПС-тері екі валентті катиондармен тұрақтанылмаған деген қорытынды жасауына негіз болды. Зерттеушілердің пікірінше, бруцелланың иондық емес детергенттік заттарға төзімділігі олардың мембранасындағы ұзын тізбекті аминқышқылдарының әдеттен тыс жоғары концентрациясымен байланысты болып отыр. Сондықтан да, анағұрлым тиімді

иондық детергент заттарды, атап айтсақ саркозинат пен цвиттергентті пайдалана отыра, олар бруцелланың жасуша қабырғасынан бірнеше ақуыздарды бөліп алды. Авторлар *B. abortus* 45/20 және 1119-3 қатпарлы және тегіс штамдарының жасушаларын 50°C температурада 0,7% ДСН еритіндісімен экстракциялау арқылы бөлініп алынған пептидоглиоканның құрамында матрикстік ақуызды тапқан. Зерттеушілер бұл ақуыз сыртқы мембрананың үшінші тобының ақуызы болып табылады деген қорытындыға келді.

ПААГ-ДСН электрофорез әдісімен *B. abortus* 99-тың лизоциммен өңделген пептидоглиоканын зерттеу кезінде ақуыздардың екі негізгі тобы анықталған: 38, 37, 36 кДа және 27, 26, 25 кДа [95]. 2% тритонмен алдын ала өңделген жасуша қабырғаларын ПААГ-ДСН электрофорез көмегімен талдау кезінде молекулалық салмақтары 40 кДа болатын 1 ақуыз және одан басқа 39 минорлық ақуыздар табылған. Зерттеушілер бруцелланың жасуша қабырғасында кем дегенде ДСН еритіндісімен 40 ақуыз және пептидоглиоканмен байланысқан ақуыздардың 2 тобы бар деген қорытындыға келген.

ПААГ-ДСН көмегімен *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis* және *B. melitensis* 15 қатпарлы және 20 тегіс штамдарының негізгі СМА-дары сипатталынды [98]. СМА-ден пептидоглиоканды бөліп алу үшін Triton X-100 немесе натрийдезоксихолаты қолданылған. Пептидоглиоканнан ақуыздар лизоцимнің көмегімен бөлініп алынған. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, бруцелланың барлық түрлерінде ақуыздардың үш тобы табылды. Олардың біріншісінде орташа молекулалық салмағы 94–88 кДа, екіншісінде 39–35 кДа, үшіншісінде 31–25 кДа болатын ақуыздар болды. Кейінірек, 2-топ ақуыздары поринақуыздарына жататындығы дәлелденді [99]. Бруцелланың периплазмалық және поринді емес мембраналық ақуыздарының тұз сығындысы жоғары өнімді сұйық хроматография әдісімен зерттелді [100]. Авторлар денатурация жағдайында молекулалық салмақтары 10-нан 51 кДа-ға дейінгі аралықтағы мембраналық ақуыздардың бөлінетіндігін жазған. Бұл еритін ақуыздар теңіз шошқалары, қояндар мен сиырлар үшін антигенді болып келген, және леммингтердің, теңіз шошқаларының және сиыр малының иммунды жауаптарын тудыра алған. Бұл антигендердің 14,4 кДа ақуыздан басқалары периплазмалық ақуызар екендігі анықталды. Сонымен қатар, еритін ақуыздар вакцинацияланған және тәжірибелік жолмен жұқтырылған ірі қара малдың сарысуында *B. abortus*-қа қарсы антиденелерді анықтауға арналған ИФТ-да тұрақты және нақты нәтижелер көрсеткен. Молекулалық салмақтары 88 кДа, 40-35 кДа және 30-25 кДа болатын ақуыздардың үш тобы *B. abortus*-тың 49 штамының ақуыз құрамын зерттеу барысында да табылған [101].

Молекулалық салмағы 8 кДа болатын ақуыз фрагменті ДСН көмегімен экстракцияланған бруцелла пептидоглиоканына трипсинмен әсер ету арқылы бөлініп алынған [97]. Молекулалық салмағы, аминқышқылдарының құрамы және изоэлектрлік нүктесі бойынша бұл ақуыздар ішек таяқшасының Браун ЛПС-ына ұқсайды және құрамында эфир және амидпен байланысқан май қышқылдары бар болып шықты.

B. canis жасушасында мол. с. 18, 22, 31, 42 және 54 кДа болатын ақуыздар анықталды [102]. Инфекциядан кейін 8-10 аптада алынған иттердің қан сарысуында иммунохимиялық жолмен мол. с. 20 кДа болатын ақуыз анықталған, алайда жұқтырылғаннан кейін 6 ай өткенде аталмыш ақуызға телімді антиденелер тұрақты түрде анықталынбады. Мол. с. 18 және 22 кДа болатын ақуыздар тұрақты түрде анықталынып отырған.

СМА-дардың диагностикалық құндылығы әртүрлі серологиялық және иммунологиялық сынақтарды қолдану арқылы зерттелген. Мысалы, қойдың қан сарысуындағы анти- *B. ovis* антиденелерді анықтау жануарлардың бірнеше тобы пайдаланылған: 1) бақылау тобы, 2) табиғи жолмен жұқтырылған жануарлар, 3) *B. ovis* -пен көктамыр арқылы жұқтырылған жануарлар және 4) бұлшықет ішіне жұқтырылған жануарлар [103]. Планшетте иммобилизацияланған антигендер ретінде *B. ovis*-тің тұтас жасушалары, ЛПС-тері және сыртқы мембрана компоненттері пайдаланылды. Табиғи ауруға шалдыққан және бұлшықет ішіне екпе алған қойларда *B. ovis*-тің тұтас жасушаларына қарсы антиденелердің белсенділігінің жоғары деңгейі болды, ал ЛПС-ке қарсы антиденелердің белсенділігі тек бұлшықет ішіне вакцина алған малдарда ғана анықталды. *B. ovis*-тің сыртқы қабықшасының сығындыларынан алынған антигенмен табиғи жолмен ауруға ұшыраған қойлардың сарысуларындағы антиденелер жақсы әрекеттесе алды.

B. melitensis-тің СМА-на қарсы G- (IgG) және M-иммуноглобулиндерінің (IgM) түзілуі ИФТ-мен анықталынды [104]. Бұл сыналым *B. abortus* жасушаларымен стандартты микроагглютинацияға қарағанда антиденелерді анықтауда аса сезімтал болды. ИФТВ. *Canis* тудырған адам мен ит бруцеллезін диагностикалауда да сезімтал болды. Бұл ретте *B. abortus* жасушаларымен қойылған микроагглютинация *B. canis*-ке қарсы антиденелерді анықтай алмады. Осыған ұқсас зерттеулер сау адамдар мен бруцеллез ауыруына ұшырағын науқастардың қан сарысуларындағы IgG, IgM және IgA титрлерін анықтау мақсатында да жүргізілді [105]. СМА-ына қарсы антиденелер титрі тұтас жасушаларға бағытталған антиденелер титрінің деңгейінде болды және екі антиген мен IgG, IgM және IgA араларындағы корреляция коэффициенттері 0,73-тен 0,94-ке дейінгі аралықта болды. Авторлардың пікірінше, екі антиген де ИФТ-інде бруцеллезге қарсы иммуноглобулиндерді жоғары сезімталдықпен және телімділікпен ($\geq 95\%$) анықтай үшін қолданыс таба алады.

B. ovis-тің ЛПС және СМА үш тобының антигендік реактивтілігі иммуноблотинг арқылы зерттелінді [106]. Нәтижелер *B. ovis*-тің ЛПС-тері вакцинацияланған немесе табиғи жолмен жұқтырылған қошқарлардың сарысуларына қарсы жақсы антигендік қабілеті бар екенін көрсетті. Кейбір СМА-дар жұқтырылған қошқарлардың емес, вакцинацияланған малдардың сарысуларымен жақсы әрекеттесе алды. Бұл жағдай иммунитетті немесе инфекцияны болжауда мұндай ақуыздардың ықтимал диагностикалық рөлін көрсетеді. Басқа зерттеулерде *B. abortus* 19 штаммымен жұқтырылған (1-топ) және екпе алғаннан кейін жұқтырылған (2-топ) сиырлардың антиденелері бруцеллалардың мол. с. 31 - 45 кДа болатын ерігіш ақуыздарымен әрекеттесе

алған [107]. 2-ші топтағы жануарлардың иммуноглобулиндері мол. с. 66-дан 71 кДа-ға дейінгі аралықтағы ақуыз фракцияларын анықтады. Алайда, алғашқы рет егілген бұзаулардың (құнажындардың) антиденелері ерігіш ақуыз жолақтарымен байланыспаған. E.M. Hoffmann et al. өз жұмыстарында осындай мәліметтерге ұқсас нәтижелерді келтірген [108]. Зерттеушілердің нәтижелеріне сүйенсек, бруцеллезбен ауырған сиырлар да *B. abortus* 1119-3 штаммының полисахаридті емес компонентіне телімді иммуноглобулиндерді түзген, ал *B. abortus* 19 вакцинасымен егілген жануарлар бұл антигенге қарсы антиденелердің мардымды мөлшерін синтездей алмаған. R.Kittelberger және M.P.Reichel [109] бұғылардың қан сарысуындағы *B. ovis*-ке қарсы телімді антиденелерді анықтау үшін арналған иммуноблоттинг әдісін қолданған.

Жанама ИФТ-ды иттердің қан сарысуындағы *Brucella*-ның мол. с. 18 кДа болатын цитоплазмалық ақуызына қарсы антиденелерді анықтау мақсатында сынақтан өткізген [110]. Сынақ кезінде ИФТ және меркаптоэтанолмен қойылған АР нәтижелерінің байланысы 93,3% құрады. Қолданылған тәсіл жоғарғы телімділікті көрсетті: сау иттерден алынған қан сарысулардың 103 үлгісінің тек 2-і ғана оң нәтиже көрсеткен.

Кейінгі жылдары Cu-Zn-СОД (супероксиддисмутаза) периплазмалық ақуызы бруцеллез инфекциясы патогенезінің әмбебап механизмі, патогеннің антиоксиданттық жүйесінің негізгі ферменттерінің бірі ретінде қарастырыла бастады. Бруцеллалардың антиоксиданттық ферменттері – каталаза, пероксидаза және СОД, бос оттегі радикалдарын бейтараптандыру арқылы патогеннің фагоцитозға төзімділігін күшейтіп, оның қабыну ошағында тіршілігін сақтап қалуына жағдай туғызады. Бруцелланың организмдегі персистенциясы инфекциялық процестің ағымын нашарлатып, аурудың созылмалы түрде өтуіне жағдай тудырады. Сондықтан Cu-Zn-СОД бруцелланың периплазмасында бола отырып, мембраналық және периплазмалық құрылымдарды супероксидтердің экзогендік әсерінен қорғайды және патогендік факторлардың бірі болып табылады. СОД деңгейінің өзгеруін сипаттайтын көрсеткіштер аурудың прогнозын болжайтын негізгі факторлардың бірі болмақ. Зерттеушілер, сонымен қатар, *B. abortus*-тың Cu-Zn-СОД антиоксиданттық ферментінің протективті әлеуетінің *B. abortus* RB51 штаммымен вакцинацияланған жануарларда қалыптасқан иммунитеттен кем түспейтінін жазған [111,112].

МКА көмегімен *Brucella*-лардың 7СМА-дары анықталды. Бұл антиденелер тышқандарды SDS-I-дің ерімейтін фракцияларымен, жасуша қабырғаларымен немесе *B. abortus* және *B. melitensis* бактерияларының тұтас жасушаларымен иммундеу арқылы алынды. Аталмыш МКА-мен танылған СМА-дары мол. с. 25-27 кДа және 36-38 кДа-ға дейінгі аралықтағы мажорлы ақуыздар болып шықты. Сонымен қатар, кейбір антиденелер мол. с. 10, 16,5, 19, 31-34 және 89 кДа болатын минорлы ақуыздармен байланысқа түскен [113]. Кейінірек 3 минорлы ақуыздар, атап айтсақ СМА10, СМА16 және СМА19 бруцелланың барлық негізгі түрлерінде, соның ішінде олардың биоварларында экспрессияланатыны анықталды [114]. Tibor et al. жоғарыда аталған үш СМА-

аминқышқылдарының орналасу ретін талдау нәтижесінде олардың барлығы липопроteidтер деген қорытындыға келді [115].

ИФТ-да бруцеллалардың 3 түрлі антигенін: *B. abortus*-тың цитоплазмалық ақуыздарын, *Brucella spp.* люмазинсинтазасын және құрамында СМА бар *B. canis*-тың ыстық тұз ерітіндісінен алынған сығындысын қолдану негізінде иммунологиялық талдаудың 3 нұсқасының салыстырмалы сипаттамасы берілді [116]. МКА-дің 3 түрі бруцеллезге күдікті және бруцеллезбен ауыратын иттердің, сондай-ақ бруцеллезбен байланысты емес патологиясы бар иттердің сарысуларын тексеру үшін пайдаланылды. Нәтижелер иттердің бруцеллезін диагностикалауда цитоплазмалық және сыртқы мембраналық ақуыздарға негізделген ИФТ-дың жоғары телімділік пен сезімталдық көрсететіндігі анықталды. Одан қалды, бұл тест бруцеллез ауруын инфекцияның бастапқы кезеңінде анықтай алды.

B. abortus 19-дың СМА-дары бруцеллездің диагностикасында дәстүрлі серологиялық зерттеулермен, соның ішінде аталмыш штаммның тұтас жасушаларына негізделген ИФТ әдісімен салыстырылған [117]. 1041 сиырдың қан сарысуы үлгілерінен АР, КБР және ИФТ мал басының тиісінше 2,6%, 2,1% және 4,3%-ында бруцеллезге қарсы антиденелердің бар екендігін, ал СМА-дары иммунды талдауда бруцеллез қоздырғышына тән антиденелерді сиырлардың 5,7%-ында анықтады. Айта кететін маңызды мәселе - ИФТ/СМА қолданылған барлық дәстүрлі серологиялық реакциялардың оң нәтижелерін толығымен растап, басқа сиырлардан да бруцеллезге қарсы антиденелерді анықтап, өзінің жоғары сезімталдығын көрсетті.

Бруцелланың СМА және ЛПС антигендерін қолдана отыра 1483 сиыр ИФТ-інде бруцеллез ауруына тексерілген. Алынған нәтижелер ИФТ/ЛПС қолданған жағдайда бруцеллезге оң реакция берген мал саны ИФТ/СМА-ға қарағанда 1,4 есе жоғары болды. Авторлар бұл «артықшылықты» сау жануарлардың қан сарысуында *Бруцелла* ЛПС антигендерімен айқыш-реакцияға түсетін антиденелердің болуымен түсіндіреді.

Қорыта келе, әдеби шолудың бұл бөлімінде келтірілген деректер бруцеллездің серодиагностикасын жетілдіру бағытында ауру қоздырғышының ақуыз антигендерін қолданудың болашағы зор екендігін көрсетеді. Екпе ретінде бруцеллезге қарсы егілген тірі вакцина штаммдары мал организмінде көп уақыт тұрақтанбайды. Сондықтан да иммундық жүйе қоздырғыштың тек үстіңгі қабатындағы ЛПС-термен ғана танысып, оларға қарсы антиденелер түзейді, ал полисахаридтерден төменірек орналасқан ақуыздар иммунитет жасушаларының назарынан тыс қалады. Міне, сондықтан да екпе егілген мал, негізінен, антиденелерді ЛПС-терге қарсы өндіреді. Ал, ауруға ұшыраған малдың денесінде, өзінің таңдаулы ұлпаларынан орын алуға ұмтылған патогенмен, ұзақ және ымырасыз күрес орын алады. Нәтижесінде иммундық жүйенің жасушалары қоздырғыш қабырғасының тереңірек құрамдас бөліктерімен, яғни ақуыздарымен танысуға мүмкіншілікке ие болады. Қорыта келе, серологиялық зерттеулер кезінде қан сарысуынан *Brucella*-ның СМА-ына телімді антиденелердің табылуы – малдың бруцеллез ауруына шалдыққанының

дәлелі болмақ деген тұжырымға келуге болады.

1.3 Бруцеллезді дәстүрлі серологиялық балау тәсілдері

Зоонозды ауру болып табылатын бруцеллезбен күрес шараларының арасында ауру малды дер кезінде және дәл анықтау өте маңызды болып табылады. Клиникалық диагноз әдетте үй жануарларының репродуктивті қызметінің бұзылуына негізделеді. Дегенмен бұл белгі патогномоникалық болып есептелмейді, сондықтан да нақты диагноз қою үшін микроскопия және/немесе ПТР әдістерінің көмегімен патматериалда *Brucella spp.* бар екенін дәлелдеу қажет және қоздырғыш антигендерінің және қан сарысуында (сүтте) телімді антиденелердің иммунологиялық тәсілдермен анықталғандығын көрсету керек. Кейінгі кезде бруцеллез диагностикасын жетілдіру мақсатында жасушалық иммундық жауаптың даму барысын зерттеу де ұсынылып отыр. Дегенмен, бүгінгі күнге дейін бактериологиялық әдіс, яғни бруцеллаларды патматериалдан өсінді ретінде бөліп алу - ауру диагностикасының “алтын стандарты” ретінде саналады. Алайда, бұл әдіс ұзақ мерзімді, білікті бактериологтарды қажет етеді және мал басын жаппай тексеруде қолданыла алмайды. Осыған орай, бруцеллез балауында серологиялық әдіс ең тиімді әдіс болып қалып отыр.

Бүгінгі күні бруцеллездің зертханалық балауында қолданылып жүрген серологиялық сыналымдар індетті жоюға бағытталған шаралардың арасындағы негізгілердің бірі болып саналады. Бұл сыналымдарда бруцеллаларға телімді антиденелерді анықтау үшін антигендер ретінде тұтас бактериялық жасушалар немесе тазартылған фракциялар (мысалы, липополисахаридтер) қолданылады. Қазіргі таңда серологиялық реакциялардың арасында кең қолданыс тауып отырған агглютинация реакциясы (АР), роз-бенгал сынамасы (РБС) және комплемент байланыстыру реакциялары (КБР). Соңғы уақытта бруцелланың ЛПС-терін қолдануға негізделген ИФТ-сыналым жүйелері де диагностикалық практикада қолданыс таба бастады. Сонымен қатар, мал дәрігерлік зертханалардың арсеналында скрининг сыналымдары да бар. Айталық, сүтпен қойылатын сақина реакциясы және диагнозды растайтын қосымша сыналымдар (мысалы, 2-меркаптоэтанолмен қойылатын АР, флуоресценцияның поляризациясын талдау). Төменде бруцеллез диагностикасында қолданыс тауып отырған сыналымдарға қысқаша мінездемелер келтірілген.

Агглютинация реакциясы—телімді антиденелердің бруцелла жасушаларын шыны түтікте баяу агглютинацияға (желімделуіне) әкелетін стандартты сыналым. Бұл реакция бейтарап рН кезінде бактериялық антигеннің антиденелермен, атап айтқанда IgM иммуноглобулинмен, агглютинациялауына негізделген бруцеллезді диагностикалауға арналған алғашқы серологиялық сыналым болып табылады. Бұл сыналымның телімділігі төмен болғандықтан басқа серологиялық реакциялармен бірге қолданылады [118,119].

Комплемент байланыстыру реакциясы салыстырмалы түрде жоғары дәлдікпен сипатталады, сондықтан да КБР *B.abortus*, *B.melitensis* және *B. ovis* қоздырғыштарынан туындаған бруцеллезді растаушы сыналым ретінде қолданылады. КБР малдыхалықаралық тасымалдау кезінде ХЭБ ұсынылған

эталондық сыналым болып табылады [119, 120]. Дегенмен реакцияның кейбір кемшіліктері бар. Мысалы, бағасының жоғары болуы, орындау күрделілігі, арнайы құрал-жабдықтар мен дайындалған зертханалық қызметкерлердің қажеттілігі және т.б. КБР-ында гемолизирленген сарысу және антикомплементарлы белсенділігі бар сарысу үлгілерін қолдануға болмайды. Сонымен қатар, бұл реакцияда прозон феномені де байқалады [121]. Сыналымның сезімталдығы 77-100%, ал телімділігі 65-100% аралығында ауытқиды [122].

Роз бенгал сынаамасы нативті сарысу және рН 3,6-3,7 болатын *V. abortus*-тың боялған жасушаларымен пластинкада өткізілетін экспресс-талдау әдісі болып табылады. Сынаманы қою қарапайымдылығы ресурстары шектелген шағын зертханаларда РБС-ды скринингтік тест ретінде кеңінен қолдануға мүмкіндік беріп отыр. РБС кемшіліктері ретінде оның сезімталдығының төменділігін (әсіресе аурудың созылмалы жағдайларда) және эндемикалық аймақтарда телімділігінің төмен болуын айтуға болады. Сонымен қатар РБС эндемикалық аймақтардың малдарын бруцеллезге зерттеген кезде кей жағдайларда прозона феноменін көрсетеді, яғни титрі жоғары қансарысулары бұл сыналымда теріс нәтижелер көрсетіп жатады [123]. Осыған орай, сыналымның телімділігін жоғарылату үшін сарысуларды сұйылтылған түрлерінде зерттеу қажет (1:2 ден 1:64 дейін)[124]. Бүкіл әлемдік денсаулық сақтау ұйымының ұсыныстарына сәйкес РБС нәтижелері АР-сы секілді басқа да сыналымдармен нақтылануы керек [125].

Иммуноферменттік талдау бруцеллездің серологиялық диагностикасында кең таралған сыналымдардың бірі болып табылады. Бұл тест IgG, IgA және IgM антиденелерінің мөлшерлерін анықтай алатындықтан, клиникалық жағдайға жақсы интерпретация жасауға мүмкіндік береді. Мал дәрігерлік препараттар нарығында коммерциялық ИФТ-жиынтықтарында әдетте антиген ретінде бруцелланың тегіс ЛПС препараттары қолданылады. Сыналымның IgM антиденелеріне қарағанда IgG антиденелерін анықтауда сезімталдығы жоғарырақ болып келеді, бірақ телімділігі жағынан айырмышылықтары болмайды [126]. Агглютинацияның дәстүрлі әдістерімен салыстырғанда, бруцеллездің жіті және созылмалы кезеңдерінде ИФТ сезімталдығы жоғарырақ және эндемиялық аймақтарда бруцеллезді балауда айтарлықтай артықшылығы бар. Күмәнді жағдайда ИФТ/IgM және ИФТ/IgG комбинациясын қолдану қажет. Өйткені, бұл зертханалық сыналымдардың комбинациясы *Brucella* телімді антиденелерді анықтауда аса тиімді әдіс болып табылып отыр. Әрі қарай бақылау және болжау мониторингіне ИФТ/IgM және ИФТ/ 2-меркаптоэтанол әдісі ұсынылған [127]. ИФТ мал басын бруцеллезге жаппай серологиялық балау жүргізуге мүмкіндік беретін өте тиімді әдіс. Сонымен қатар ол аурудың жіті фазасын оның созылмалы түрінен ажыра алатын бірден-бір тәсіл[128]. Дәстүрлі серологиялық реакциялар бруцеллезге теріс нәтиже берсе де індетке клиникалық күмән туып жатса ИФТ объективті сыналым ретінде қолданыла алады. Ол жеке және жалпы телімді иммуноглобулиндерді (IgG, IgA және IgM) 4-6 сағаттың ішінде жоғары

сезімталдық пен телімділікпен анықтауға мүмкіндік береді. Иммуноглобулиндердің класын анықтаумен қатар, ИФТ IgG класының жеке түрлерін және бруцеллаға телімді басқа иммуноглобулиндерді анықтауға мүмкіндік береді (мысалы, IgE) [125]. Алайда, бүгінгі таңда белгілі ИФТ – сыналымдары осы күнге дейін бруцелланың вирулентті штамдарына телімді антигендерінің болмауынан жұқтырған және вакцинацияланған жануарларды бір-бірінен нақты ажыратуға мүмкіндік бермей отыр.

Сақина реакциясы - сүттегі антиденелердің боялған бруцелла жасушаларын агглютинациялау феноменіне негізделген. Бұл сыналым танкерлердегі (үлкен сыйымдылықтардағы) бірнеше сиырлардан алынған сүт үлгілерін скрининг жасауға мүмкіндік береді. Ол мал табындарын немесе бруцеллезден таза аумақтардағы мал басын бақылау үшін өте пайдалы, сондықтан мониторингтік (бақылау) сынағы ретінде танылып отыр. Айта кететін маңызды жағдай - сақина реакциясының жалған оң нәтижелерінің саны қышқыл сүт бөлетін сиырлардың санына (айталық, желінсау сиырлар және уыз сүт) пропорционалды болып келеді [119]. Сақина реакциясының оң нәтижесі табын ішінде бруцеллезбен жұқтырылған сиырдың бар екенін білдіреді. Бұл жағдайда табынның барлық сиырлары жеке серологиялық зерттеулерге тартылады.

2-меркаптоэтанол реакциясымен қойылатын AP зерттелетін үлгідегі IgM антиденелерін инактивациялай отыра, бруцеллаға қарсы IgG антиденелерінің мөлшерін селективті түрде анықтауға мүмкіндік береді. IgG антиденелері әдетте созылмалы инфекциямен байланысты болып келеді, сондықтан бұл сыналымның оң нәтижелері бруцеллездің нақты белгісі болып саналады. Дегенмен, бұл сыналымның кейбір кемшіліктері бар. Мысалы, жұмыс барысында сорғыш шкафты қажет ететін уытты меркаптоэтанол қолданылады; 2-меркаптоэтанол IgG антиденелерінің деградациясын тудырып, реакцияның жалған теріс нәтижелер көрсетуіне себепкер болуы мүмкін. 2-меркаптоэтанол реакциясымен қойылатын AP-ның сезімталдылығы 88-99%, ал телімділігі 92 - 99% деңгейінде болып отыр.

Этилендиаминотетрасірке қышқылымен агглютинация реакциясы (AP-ЭДТА). AP-ында ЭДТА қолдану айқыш реакциялардың ықтималдығын азайтып, сыналымның телімділігін айтарлықтай арттыра алады. Сондықтан да AP-ының бұл түрін дәстүрлі AP-ға балама ретінде пайдалануға болады [129, 130]. ЭДТА-ның реакция телімділігін қалай төмендете алатындығы осы күнге дейін түсініксіз. Дегенмен кейбір дереккөздерде бұл реагент антидененің Fc фрагментінің бруцелла жасуша қабырғасына жабысуының алды алады деген тұжырым жасалған [131]. Бұл сыналым принципі – қан сарысуының рН-ын IgM изоэлектрикалық нүктесіне дейін өзгертіп, антиденелердің агглютинациясының алдын алу.

Полярзациялық флуоресцентті талдау (ПФТ) қан сарысу үлгілерін зерттеуге арналған. Кейінірек, бұл талдау жануарлардың сүті мен тұтас қан үлгілерін тексеру үшін де қолданыла бастады. ПФТ ерітіндідегі антигеннің аз көлемдегі молекуласымен және антиген мен антидене молекуласы кешенінің

арасындағы айналу айырмашылығына негізделген. Ол антиген ретінде флуоресцентті таңбаланған молекуланың көлемін өлшейді. *Brucella*-ның ЛПС-нің О-бүйірлік тізбегін қолдану үміттендіретін нәтиже көрсетті. ПФТ дәстүрлі серологиялық реакцияларды толықтыратын құнды балама ретінде таныла бастады. Ол адам бруцеллезін балауда [132] және малдың бірнеше түрлерінің тұтас қанын, сүтін, қан сарысуларын аталмыш індетке тексеру кезінде қолданылған. Сыналымды дала жағдайында да қолдануға болады [133], ал сезімталдығы бойынша ол ИФТ-нан кем түспейді [134].

Кумбс реакциясы – бруцеллездің рецидивін анықтау үшін ең қолайлы және сезімтал сыналым болып табылады [124]. Ол бұғаттаушы толымсыз IgG антиденелердің әсерінен АР-ында агглютинация болмаған жағдайда қосымша сыналым ретінде қолданылады. Кумбс реакциясын қою көп уақытты алады, техникалық жағынан қиын және білікті мамандарды қажет. Сондықтан да бұл сыналым әдетте диагностикалық зертханаларда қолданыла бермейді. Бұл реакция бруцеллездің күрделі және созылмалы жағдайларында жақсы жағынан танылып отыр. Дегенмен, оның сезімталдығы ИФТ-дан айтарлықтай төмен болып келеді [135].

Агар геліндегі иммундыдиффузиялық сыналым антиген-антидене кешенінің преципитациясына негізделген. Бұл әдісті көп жағдайда *B. ovis* тудырған бруцеллез ауруын балауда қолданады. Сыналымның басқа серологиялық реакциялармен салыстырғанда құны төмен, оңай орындалады және сезімталдылығы жағынан КБР-ынан кем түспейді. Дегенмен, кемшіліктері де аз емес. Айталық, бруцеллездің созылмалы түрінде оның сезімталдығы айтарлықтай төмендейді және бұл сыналымда қолданылатын қолжетімді коммерциялық антигендер сапа жағынан бірегей болып келмейді. Сондықтан да ПТР секілді қосымша балау әдістерін қолдану ұсынылып отыр [136].

Иммунды кешенді агглютинациялау реакциясы (Brucella capt) бруцеллез балауындағы сезімталдығы жоғары заманауи сыналымдардың бірі. Бұл реакция антигенді агглютинациялайтын толымды антиденелермен қатар оны агглютинациялай алмайтын толымсыз антиденелерді анықтауға арналған. Бұл сыналым сэнвич-ИФТ жүйесіне негізделген. Сыналымда ең әуелі IgG, IgA және/немесе IgM антиденелеріне қарсы бағытталған антитүрлік антиденелермен микропланшет ұяшықтары толтырылады. Реакция U-тәрізді түбі бар микротитрлеуге арналған ұяшықтарда жүргізіледі. Зерттелетін сарысуды және корпускулярлы антигенді ұяшықтарға құйғаннан кейін планшетті бөлме температурасында 24 сағатқа қалдырады. Үлгіде толымсыз антиденелер болған жағдайда, соңғылары бруцелланың жасушаларымен байланысады, ал бұл иммунды кешен антитүрлік антиденелермен ұсталады. Нәтижесінде ұяшық түбінде қолшатыр түріндегі агглютинат түзіледі [137]. *Brucellacapt* өзінің сезімталдығы мен телімділігі бойынша Кумбс реакциясынан кем түспейді, ал артықшылығы - бір сатылы реакция. Бұл әдіс қолданыстағы жедел сыналымдарды алмастыра алмаса да, адам мен мал бруцеллезінің созылмалы түрін балауда өте пайдалы болып отыр [124, 139].

Иммунды хроматографиялық талдау (ИХТ) – зертханадан тыс, дала жағдайында малды бруцеллез ауруына тексеруге арналған экспресс-талдау. Бұл сыналым ИФТ-дың жеңілдетілген нұсқасы болып табылады. Сыналымның бруцеллаға қарсы түзілген IgG және IgM антиденелерді анықтауда жоғары сезімталдығы мен телімділігі әртүрлі зерттеулерде дәлелденген. Т. Abdoel et al. (2008) ірі қара мал, ешкі, қой және шошқа бруцеллезін серодиагностикалау үшін төрт қарапайым және далалық экспресс сыналымдар әзірлеген. ИХТ тиімділігі Португалияның бруцеллез бойынша санитариялық статусы белгілі табындарындағы мал басынан алынған қан сарысу үлгілерін серологиялық зерттеу кезінде анықталды. Патматериалдардан қоздырғыш өсіндісін бөліп алу арқылы расталған сиыр, ешкі, қой және шошқа бруцеллезін ИХТ тиісінше 90%, 100%, 90% және 73% мал басынан анықтады. Бруцеллезден таза табындағы малдан алынған бірде-бір қан сарысу үлгісі ИХТ-да оң нәтиже көрсетпеді, бұл оның жоғары сезімталдығын дәлелдейді. Дегенмен, дәстүрлі серологиялық реакцияларда жалған оң нәтиже берген кейбір сарысулар ИХТ-ында да реактивтілігін көрсеткен [140].

Бруцеллинтері аллергиялық сыналымы - бұл *Brucella spp.* тудыратын арнайы жасушалық иммундық жауапты анықтайтын аллергиялық сыналым. Аллерген ретінде *Brucella*-ның қатпарлы штамының ақуыз сығындысы қолданылады. Олауру қоздырғышының өнімдерімен сенсбилизацияланған малда жергілікті қабыну реакциясы мен гиперсезімталдылықтың баяу түрін қалыптастырады. Реакция нәтижелері егу орнындағы терінің қалыңдығын анықтау арқылы өлшенеді. Бұл сыналым бруцеллездің шынайы жағдайларын жалған оң серологиялық реакциялардан ажыратуда өте тиімді. Бруцеллин тері аллергиялық сыналымы өте телімді, ал оның төмен сезімталдығы малды бруцеллезге скринингтік тексеру үшін қолайлы әдіс болып табылады. Алайда, бұл сыналым да постинфекцияны поствакцинациялық жағдайдан ажырата алмайды [141]. Дәстүрлі серологиялық реакциялар бойынша жалған оң нәтиже берген қан сарысуларын тексерген кезде бруцеллин тері аллергиялық сыналымының РБС және КБР-сына қарағанда телімділігі айтралықтай жоғары болған. Сондықтан да бұл сынамань бруцеллезге қарсы егілмеген ірі қара малдың бруцеллезін диагностикалауда растаушы тест ретінде пайдалануға болады деген пікір айтылған [142]. Бұл сынақты ХЭБ балама сынақ ретінде ұсынып отыр.

Қорыта айтқанда, серологиялық реакциялар мал бруцеллезінің *in vivo* диагностикасының негізгі әдістері болып қала береді және аталмыш індетпен күресуге бағытталған мал дәрігерлік-санитариялық шаралар кешенінде маңызды орын алады. Бруцеллезге шалдыққан мал басын анықтау мақсатында қолданылып жүрген серологиялық реакциялардың ішінде ИФТ-дың әртүрлі нұсқалары салыстырмалы түрде жоғары сезімталдыққа ие болып отыр. Алайда, ИФТ-да бруцелланың тегіс штаммдарының ЛПС-терінің қолдануы басқа грамтеріс бактериялармен ортақ эпитоптары есебінен иммунологиялық талдаудың телімділігін айтарлықтай төмендетеді. Міне, сондықтан да *Brucella*

тұқымдастарына тән антигендерді іздестіру бруцеллездің серологиялық балауын жетілдірудің негізгі шарты болмақ.

1.4 *Brucella*-ның рекомбинантты ақуыздары және оларды серологиялық диагностиканы жетілдіруде қолдану

Бруцеллездің диагностикасын жетілдіру ветеринария ғылымы мен практикасының маңызды мәселелерінің бірі болып отыр, өйткені аурудың инкубациялық кезеңі адам мен әртүрге жататын жан-жануарларда 5 күннен 5 айға дейін созыла алады, ал ауру ешбір клиникалық белгілерсіз, жедел немесе созылмалы түрде өтуі мүмкін [143]. Бруцеллездің жіті фазасының симптомы (адамдарда әлсіздік пен дене қызуы және жануарларда түсік тастау) әртүрлі ауруларға тән болып келеді [26]. Сондықтан да бруцеллезге нақты диагноз қою үшін міндетті түрде зертханалық зерттеулермен расталу керек. Бруцеллездің клиникалық белгілері апатогномиялық болғандықтан диагноз қою үшін микроскопиялық және/немесе ПТР әдістерін қолдана отыра патматериалда *Brucella*-ның бар екендігін дәлелдеу керек немесе зерттеу үлгілерінде қоздырғыштың антигендерін және/немесе оларға тән телімді антиденелерді иммунологиялық әдістермен анықтау қажет [144, 145]. Бактериологиялық әдіс, яғни қоздырғышты бөліп алу – бруцеллез ауруының «алтын стандарты» болып саналады, алайда оның сезімталдығы төмен және зертхана қызметкерлері үшін қауіпсіз емес. Осы себептен, серологиялық диагностика бруцеллезді балаудың ең кең тараған және қолайлы әдісі болып қала береді.

Бруцеллезді жоюға бағытталған мал дәрігерлік-санитариялық шаралар кешенінің маңызды буыны - дер кезінде және дәл диагноз қою болып табылады. Дегенмен, дәстүрлі серологиялық зерттеулер көптеген факторларға, айталық зерттелетін үлгінің жағдайына, малдың иммундық күйіне, инфекцияның таралуы деңгейіне және т.б. байланысты бір-бірімен сәйкес келе бермейтін нәтижелерді береді, Бұл классикалық сыналымдарда әдетте бруцеллезді балау үшін *B. abortus* S19 штамынан алынған антигендер қолданылады [1]. Өкінішке орай дәстүрлі әдістер *B.abortus* S19 тегіс штаммымен егілген малды ауру малдардан ажыратуға мүмкіндік бермейді. Сонымен қатар, грам теріс микроорганизмдердің ЛПС-нің бір-бірімен өзара антигендік ұқсастығына орай *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* 09 және басқа да бактерияларға қарсы түзілген антиденелер бруцеллалармен айқыш реакцияға түсіп, серологиялық сыналымдардың телімділігін төмендетеді [146]. Міне, сондықтан да соңғы үш онжылдықта ЛПС-пен көмкерілген бруцеллалардың СМА-дары антигендер ретінде ғана емес, сонымен қатар вакцина препараттарын жасау үшін де перспективалы компоненттер ретінде жан-жақты зерттеліп келеді.

Бүгінгі күні *Brucella*-ның СМА-дары мол. с. бойынша үш топқа бөлініп отыр: 88-94 кДа (1-топ), 36-38 кДа (2-топ) және 31-34 және 25-27 кДа (3-топ) [147]. Липопротеиндер ретінде идентификацияланған мол. с.10, 16 және 19 кДа болатын минорлы ақуыздарда жеке сипатталынды [113]. Алғашқы жұмыстарда бруцеллезге қарсы егілген сиырларды ауруды жұқтырғандардан ажырату

мақсатында бруцелланың нативті ақуыздарын [148] және липополисахаридті емес антигендерін қолдану мүмкіндіктері туралы қорытындылар жасалған болатын [108]. Рекомбинантты ДНҚ технология қоздырғыштардың жеке ақуыздарын диагностикалық немесе профилактикалық препараттар ретінде қолданудың жаңа мүмкіндіктерін ашып берді. Генетикалық инженерия тәсілдерінің көмегімен зиянсыз өндіргіш-штамдардан бөлініп алынған бруцеллалардың тұрақты иммуногендік және антигендік қасиеттері бар рекомбинантты ақуыздары анағұрлым күрделі дәстүрлі технологиямен алынған антигендік препараттармен салыстырғанда серологиялық сыналымдардың қою хаттамасын стандарттауға мүмкіндік бере бастады [149].

Күйіс қайыратын жануарларда *Brucella*-ға телімді антиденелерді анықтау мақсатындамына келесі рекомбинантты ақуыздар: рСМА10, рСМА16, рСМА19, рСМА25 және рСМА36 [150], рСМА31 [151] рСМА28 (бұлақуыздың басқаша аты Вр26) [152,153] құрама рСМА (рСМА10, рСМА19, рСМА28) [154] сыналған. Бұл жұмыстар бруцеллездің серологиялық диагностикасында рСМА-дардың әлеуеті әлі де болса жеткіліксіз зерттелгенін және алынған нәтижелердің бір-бірімен сәйкес келе бермейтінін көрсетеді. Айталық, J. Letesson et al. (1997) бруцеллезбен тәжірибе жүзінде жұқтырған буаз сиырлар мен қойлардың немесе табиғи жағдайда ауруға ұшыраған малдардың антиденелері 5 рекомбинантты ақуыздармен (рСМА (рСМА10, рСМА16, рСМА19, рСМА25 және рСМА36) әрекеттесе алмаған [150].

Рекомбинантты рСМА31-дің антигенділігі бруцеллезбен ауру адамдар мен малдардың сарысуларымен ИФТ зерттелген [155]. Авторлардың мәліметтері бойынша, ауру қоздырғышына телімді антиденелер науқастардың 48%, сондай-ақ ауру қой мен иттердің тиісінше 61% және 87%-да табылған. Дегенмен, зерттеушілер аталмыш антигеннің бруцелланың басқа да рекомбинантты ақуыздарымен серологиялық сыналымдарда бірге қолдану мүмкіндігін жоққа шығармайды.

M.C. Navarro-Soto et al. (2014) *B. ovis*-тың генін *E. coli*-ге экспрессиялау арқылы рСМА31 алған және бруцеллезге серопозитивті сиыр малының қан сарысуларындағы антиденелерге бұл ақуыздың жоғары антигенділігін анықтаған [156]. Ешкі мен қой бруцеллезінің серодиагностикасында *B. melitensis*-тің рСМА31 ақуызының ИФТ-інде әлеуетін (потенциалын) РБС-мен салыстыра зерттеу иммундық талдаудың сезімталдығының төменділігін, алайда дәстүрлі сыналымға қарағанда телімділігінің жоғарылығын көрсетті [151].

рВР26 немесе рСМА28-дің антигенділігі [157], атап айтқанда оның мол. с. 10 қДа болатын иммунды доминантты аймағын зерттеу нәтижелері назар аударарлық. Зерттеушілердің пікірінше, бұл пептид ИФТ сезімталдығының жоғары деңгейін қамтамасыз етіп қана қоймай, сонымен қатар бруцеллезбен ауырған сиыр малының гуморальды реакциясын зерттеуде ақпараттық антиген қызметін атқара алады [158].

Thavaselvam D. et al. (2010) рСМА28 диагностикалық құндылығын жанама-ИФТ-нің микротитрлік планшет және нүктелі-блот нұсқаларында бағалаған [159]. Авторлардың нәтижелеріне сүйенсек, рСМА28

бактериологиялық әдіспен диагноз қойылған пациенттерден алынған сарысулардағы антиденелермен ғана байланысып, ал бактериологиялық талдауы теріс адамдардың антиденелерімен танылмаған. ИФТ-дың бұл екі форматы РБС және АР-мен 90%-дық корреляцияда болды. Планшеттік ИФТ-дың сезімталдығы мен телімділігі РБС-мен салыстырғанда 97,5 және 85,5%, ал нүктелі-блот ИФТ-ның бұл көрсеткіштері тиісінше 82,05 және 92,43% аралығында болды. Зерттеушілердің пікірінше, ИФТ-ның осы екі нұсқасы да бруцеллез бойынша эндемикалық аймақтарда тұратын адамдарды бруцеллезге скринингтік тексеру мақсатында қолдануға болады.

Келесі бір ізденістерде рСМА28 және рСМА31 ақуыздары ж-ИФТ-нің антигендері ретінде серологиялық зерттеулерге түскен қан сарысуларын бруцеллезге тексеру кезінде сыналған. Олардың 433-і клиникалық үлгілер, ал 15-і ауру қоздырғышы бөлініп алған адамдардың және 20-ы дені сау донорлардан алынған қан сарысулары болды [160]. Зерттеу нәтижелері рСМА28 ақуызы рСМА31 және нативті антигендерге (жасуша қабығының антигеніне және ультрадыбыстық антигенге) қарағанда бруцеллездің клиникалық балауы үшін қолайлырақ екендігін көрсетті.

ж-ИФТ-ындар СМА-дардың диагностикалық құндылығы бруцеллезге АР бойынша теріс (n=28) және оң (n=62) нәтижелер көрсеткен сиыр қан сарысуын қолдана отыра анықталды [153]. Бұл зерттеулерде ж-ИФТ-ы АР-ының оң және теріс көрсеткіштерін тиісінше 59 және 27 мал басында растап шықты.

S. Kumar et al. (2008) тазартылған ВР26 антигенділігін *V.abortus*-тың тұтас жасушалық лизатымен бұлшық ет ішіне имунделген қоянның сарысуын және коммерциялық бруцеллез сарысуын (Difco) қолдана отыра зерттеген [161]. Бұл ақуыз дәстүрлі серологиялық реакциялар бойынша нәтижелері анықталған 75 сиырдың қан сарысуларын ж-ИФТ-ында серологиялық зерттеуде антиген ретінде қолданылып, имунды талдауға сезімталдық пен телімділіктің жоғары деңгейін қамтамасыз еткен.

ВР26 протеинінің мол. с. 10 кДа болатын имундоминантты аймағын құрайтын пептид ИФТ-ында 408 сиырқан сарысу үлгілерін (70 бас бруцеллезге болжамды теріс, 308-і кездейсоқ үлгілер және 30-ы вакцинация алғандар) бруцеллезге скрининг кезінде антиген ретінде қолданылған [158]. Алынған мәліметтер РБС және АР нәтижелерімен салыстырылды. Болжамды теріс үлгілерді зерттегенде ИФТ-дың телімділігі тиісінше, 100 және 98,41% құрады, ал кездейсоқ үлгілер арасында имундық талдаудың РБС және АР нәтижелерімен сәйкестілігі тиісінше, 77,92% және 80,52%-ға тең болды. Вакцинацияланған мал басының арасында жалған оң нәтижелер болмады, алайда РБС және АР жалған оң нәтижелер көрсетіп, тиісінше 30% және 96,6% сиыр малының қанында антиденелердің бар екендігін көрсетті. Авторлардың пайымдауынша, ИФТ-дың бұл нұсқасы екпе алған малдың антиденелерін ауру малдың антиденелерінен ажыратуға мүмкіндік бермек.

Кейбір зерттеушілер ВР26 ақуызын ауруға шалдыққан сиыр, қой, ешкі және адам үшін имундоминантты антиген ретінде танып, оны бруцеллез инфекциясы кезінде ауру малдың гуморальды реакциясын зерттеу үшін

қолдануға болатындығын жазған [162]. Тәжірибелік жағдайларда бруцелланың әртүрлі түрлерімен (*B. melitensis* 16М, *B. melitensis* М28, *B. abortus* 2308, *B. suis* S1330) жұқтырылған қой, ешкі және сиыр малында ВР26-ға қарсы антидене түзу динамикасы зерттелген [157]. Жануарлардың сарысулары ж-ИФТ/ЛПС және ж-ИФТ/ВР26 қойылымдарында сыналған. Нәтижелер барлық ауру малдарда ЛПС-терге қарсы жоғары титрде антиденелер түзілгенін көрсетті, алайда *B. melitensis* 16М және *B. melitensis* М28 жұқтырылған қойлар мен *B. melitensis* 16М және *B. abortus* 2308 жұқтырылған ешкілер ВР26-ға қарсы антиденелерді өндірген. Демек, ж-ИФТ/ВР26 бруцелла түрлеріне ғана емес, сонымен қатар мал түрлеріне де қатысты телімділік көрсеткен. Зерттеушілердің пікірінше ЛПС антигенін ВР26-мен ауыстыру ИФТ-дің сенімділігінің шектелуіне әкелмек. Дегенмен, Р. Chaudhuri et al. (2010) бруцеллезбен ауырған сиыр, қой, ешкі және иттерді анықтауда рСМА28 үлкен диагностикалық потенциалға ие екендігін жазған еді [163].

ИФТ/рСМА28 сыналымында 382 сиыр малының қан сарысуы АР және РБС-мен салыстырмалы түрде скринингтен өткізілген. Иммунды талдаудың сезімталдығы, телімділігі және дәлділігі ИФТ/рСМА28 қойылымында тиісінше 88,7%, 93,8% және 92,9% құрады. ИФТ-ында аталмыш ақуызды сиыр бруцеллезін тек зертханалық жағдайда ғана емес, сонымен қатар дала жағдайында да балауда қолдану мүмкіндігін S. Kumar et al. (2008) жазған болатын [161].

Brucella abortus-тың рСМА28 ақуызы сиыр бруцеллезін ж-ИФТ мен латекс-агглютинация реакциясында (ЛАР) анықтау мақсатында антиген ретінде сыналған болатын. Нәтижелер көрсеткендей, ЛАР-ның сезімталдылығы, телімділігі және дәлділігі 77%, 80,6% және 78,5%-ды құраса, осы көрсеткіштер ж-ИФТ-ында тиісінше, 96,7%, 95,4%, 96,2% -ға жетті [152]. Алайда, басқа авторлардың деректері бойынша, *E. coli* жүйесінде синтезделген рекомбинантты ВР26 ақуызының ж-ИФТ-ында тиімділігі *B. ovis*-тің ыстық тұзды сығындысына қарағанда төменірек болған [164,165].

Тышқан моделімен жұмыс жүргізген зерттеушілер рСМА25, рСМА28 және рСМА31 ақуыздары негізіндегі ж-ИФТ *B. melitensis*-ке қарсы түзілген постинфекциялық антиденелерді поствакциналық және/немесе кросс-реактивті антиденелерден ажырата алады деген қорытындыға келген [166]. Дегенмен, біздің алдыңғы зерттеулеріміз көрсеткендей рСМА25 және рСМА31 ақуыздарына қарсы антиденелер ауру сиырлардан ғана емес, сонымен қатар *B. abortus*19 вакцинасымен иммунизацияланған кейбір сау малдардан да анықтауға болатынын біржақты көрсетті [167]. Сондықтан да біз сыртқы мембрана ақуыздарын ИФТ-ында немесе басқа сыналымдарда тек екпе алмаған малдарды тексеру үшін ғана қолдануға болады деген қорытындыға келдік. Ал, СМА19-ға келетін болсақ, бұл ақуыздың осы екі жағдайда сиырлардың қан сарысуындағы антиденелерге қатысты антигенділігі (реактивтілігі) әлі де толық зерттелмеген [168]. Біздің зерттеулерімізде рСМА19 ақуызының антигенділігі *Brucella abortus* 544 штаммымен тәжірибе жүзінде жұқтырылған сиыр малын серологиялық тексеріс кезінде айқын байқалды. Мысалы, егер рСМА19-ға

қарсы антиденелер жұқтырылған жануарлардың барлығында ж-ИФТ-ында 14-ші күні анықталса, рСМА25 ақуызы телімді иммуноглобулиндерді тек тәжірибенің 28-ші күні ғана айқындай алды. Осы мерзімге дейін рСМА31–ге тән антиденелер тәжірибедегі жануарлардың 25% анықталмады. Одан қалды, жұқпаның 28-ші күні рСМА19-ға қарсы антиденелердің титрі басқа екі ақуыздың титрімен салыстырғанда айтарлықтай жоғары болды. Айта кететін мәселе - *Brucella*-ның рСМА-ына қарсы антиденелерді жұқтырылған сиырлар ғана емес, сонымен қатар вакцинацияланған малдарда өндіретіндігі анықталды. Екінші бір маңызды жағдай - рСМА19, рСМА25 және рСМА31 ақуыздарын антиген ретінде жеке-жеке қолдану ИФТ-ының сезімталдығын төмендетті. Біздің ойымызша, бұл құбылыс белгілі бір жалқы ақуызды қан сарысуындағы басқа ақуыздарға телімді антиденелердің тани алмауымен байланысты болуы мүмкін.

Қазіргі кезде белгілі болып отырған ақуыздардың арасында бруцеллездің алдын-алу мен және диагностикасын жетілдіру мәселелерімен айналысатын зерттеушілер үшін ерекше қызығушылықты бруцеллалардың антиоксидантты жүйесінің негізгі ферменттерінің бірі - Cu/Zn-СОД деген периплазматикалық ақуыз тудырып отыр. Бұл ақуыздың негізінде векторлық вакциналарды [169, 170] және ДНҚ-вакциналарын дайындау мүмкіншіліктері туралы зерттеу жұмыстарының нәтижелері белгілі болып отыр [171, 172, 173]. Алайда, аталмыш ақуыздың диагностикалық құндылығына әлі де болса жеткіліксіз зерттелген болып отыр. Cu/Zn-СОД диагностикалық потенциалы ИФТ-да ит бруцеллезін анықтау кезінде антиген ретінде сыналған [174]. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, рекомбинантты ақуыз ИФТ-да және вестерн блоттингте *V. canis*-пен жұқтырылған иттің сарысуымен телімді реакцияға түскен. Авторлар ИФТ/Cu/Zn-СОД сыналымын иттерді бруцеллезге скрининг жасауға жарамды деп тапқан.

Біз өз зерттеулерімізде сыртқы мембраналық (рСМА25 және СМА31) және периплазматикалық ақуыздардың (Cu/Zn-СОД және ВР26) серологиялық әлеуеттеріне салыстырмалы зерттеулер жүргізілді [175]. Ақуыздардың алғашқылары инфекцияның жаңа ошақтарындағы ауру сиырларды анықтауда тиімдірек болса, Cu/Zn-СОД және рВР26 өз кезегінде індеттің стационарлық ошағындағы серопозитивті малдарды айқындауда өз артықшылықтарын көрсетті. Кейінгі зерттеулерімізде бруцеллезден таза фермалардағы мал басының қан сарысуларынан Cu/Zn-СОД ақуызына қарсы антиденелер табылмады. Аталмыш ақуызға қарсы антиденелердің болмауы, біздің ойымызша, мал арасында бруцеллез инфекциясының жоқ екендігінің дәлелі болмақ [176]. Бұл нәтижелер вакцинациядан кейін пайда болған антиденелерді ауру малдың антиденелерінен ажырату мақсатында Cu/Zn СОД ақуызының антиген ретінде қолдану мүмкіндігінің бар екендігін көрсетеді. Алайда, рекомбинантты ақуыздардың ИФТ-дағы антигенділік қасиеттері бойынша айырмашылықтары оларды тазарту немесе вестерн блоттинг қою кезінде денатурациялануға да байланысты болуы мүмкін. Денатурация ақуыздардың үшінші деңгейлі құрылымына, яғни иммунодоминантты эпитоптардың

құрылымына тиісті әсерін тигізеді. Одан қалды, ақуыздардың антигенділік қасиеттеріне олардың полистирол планшетіне адгезия (жабысу) деңгейі де өз ықпалын тигізеді. Сонымен қатар, иммунодоминантты ақуыздардың экспрессиясы бруцеллаларды *in vitro* және *in vivo* жағдайларында өсіру кезінде әр түрлі болуы мүмкін. Мұндай жағдайларда, тәжірибелік әдіспен немесе жабайы табиғи штаммдармен жұқтырылған малдардың антиденелеріне қарсы ақуыздардың антигенділігі әр түрлі болып келеді [149].

Ақуыз негізіндегі ИФТ-диагностикумдарының диагностикалық практикаға енгізілуіне кедергі келтіретін негізгі мәселелердің бірі - жалқы рекомбинантты ақуызды пайдаланған кезде иммуноталдаудың жеткіліксіз сезімталдығы. Егер жұқпалы аурулардың қоздырғыштарында иммундық жүйе бір уақытта әрекет ететін көптеген эпитоптар бар деп есептесек, онда бірнеше рекомбинантты ақуыздарды (құрама антигенді) бір мезгілде қолдану арқылы сенімді диагностикалық нәтижелерге қол жеткізуге болады. Мысалы, S. Díez et al. (2003) *Paracoccidioides brasiliensis*-дың мол. с. 27 қДа және 87 қДа болатын құрама (біріктірілген) ақуыздарын ж-ИФТ-да параккокцидиоидомикоз ауруының серодиагностикасында қолдануға болатындығын дәлелдеген [177]. Зерттеушілер осы ақуыздарды бөлек қолданған кездегі нәтижелермен салыстырғанда құрама антигенге негізделген сыналымның сезімталдығы мен ерекшелігінің едәуір жоғарлағанын жазған. Келесі бір зерттеулерде жалқы рСМА31 ақуызы бруцеллезбен ауру пациенттер мен жануарларды серологиялық зерттеу кезінде жеткіліксіз антигенділікті көрсеткен [155]. Авторлардың деректеріне сүйенсек, осы ақуызды ж-ИФТ қолдану бруцеллезбен ауру адамдардың 48%-ын, ал қой мен иттердің тиісінше 61% және 87%-ын ғана анықтауға мүмкіндік берген. Серологиялық диагностикада жалқы ақуыздардың жеткіліксіз диагностикалық құндылығы біздің зерттеулерімізде де анықталған болатын. Мысалы, ж-ИФТ-ында экстракцияланатын табиғи ақуыз өзінің антигенділігі бойынша рСМА28-ден едәуір асып түсті [178]. Сонымен қатар, классикалық серологиялық реакциялардың нәтижелері бойынша бруцеллезге оң нәтиже берген сиырлардың 8,2%-ының қан сарысуларында рекомбинантты ақуызға қарсы антиденелер анықталынбады. *B. abortus* RB-51 штаммымен бруцеллезге қарсы екпе алған сиырлардың қан сарысуындағы антиденелер *B. abortus* және *B. melitensis*-тің экстракцияланатын табиғи ақуыздарымен қарқынды байланысқа түсе алды, алайда ж-ИФТ-ында рСМА28 ақуызын қолданғанда антидене-антиген байланысы әлсіздеу болды. Демек, ИФТ-ының сезімталдығын жетілдіру мақсатында антиген ретінде бірнеше рекомбинантты ақуыздардан тұратын құрама антигенді пайдаланудың үлкен практикалық маңызы бар.

Ahmed I.M. et al. (2015) *B. melitensis*-тің 3 рекомбинантты ақуыздарының (рСМА25, рСМА28 және рСМА31) комбинациясына негізделген ж-ИФТ-дың тышқан моделінде бруцеллез серодиагностикасындағы құндылығын зерттеді [166]. Аталмыш ақуыздардың синтезіне жауап беретін гендер рЕТ-32 Эк/ЛІС прокариоттық жүйесіне клондалды және экспрессияланды. Алынған ақуыздар ИФТ-ның қатты фазасын сенсбилизациялау үшін бір антигенге біріктірілді.

Антидене түзуді индукциялау үшін *Balb/c* тышқандарының 3 тобы қолданылды. Бірінші топ *B. melitensis*-тің жабайы штаммымен жұқтырылды; екінші топқа *B. melitensis* Rev 1 вакцинасымен екпе жасалынды; ал үшінші топ *Y. enterocolitica* O: 9 штаммы егіледі. Антиденелік жауап РБС және ж-рекомбинантты антигенге негізделген ИФТ-ың көмегімен зерттелді. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, РБС вакцинация алған тышқандарды (2-топ) *Y. enterocolitica* O:9 (3-топ) штамымен жұқтырылған аналогтарынан ажырата алмады және оларды бруцеллезге оң нәтиже көрсеткендер қатарына жатқызып, жалған нәтиже берді деп қате жіктеді. Ал, рекомбинантты ақуыздарға негізделген ж-ИФТ болса, *B. melitensis*-тің жабайы штаммымен жұқтырылған тышқандарды (1-топ) 2-ші және 3-ші топтардағы аналогтарынан 100% сезімталдық пен телімділікті көрсете отыра, ажыратуға мүмкіндік берді. Кейінірек Н. Simborio et al. (2015) сиыр бруцеллезінің балауында құрама және/немесе жалқы рекомбинантты ақуыздардың (pCMA10, pCMA19 және pCMA28) ИФТ-дағы тиімділігін АР-сында оң және/немесе теріс нәтижелер берген сарысуларды пайдалана отыра тексерген болатын. Авторлардың деректері бойынша, құрама pCMA-дардың реактивтілігі бруцеллезге оң нәтижелі қан сарысуларында айтарлықтай жоғары болды [154].

Қорыта келе, ақуыздық "коктейльді" іздестіру бруцеллездің серологиялық диагностикасын жетілдірудегі ең перспективалы бағыт болып табылады. Алайда, *Brucella* тұқымдасының сыртқы мембраналық құрылымның негізгі ақуыздары болып табылатын CMA19, CMA25 және CMA31 комбинацияларының диагностикалық мәні әлі де болса зерттелмеген күйінде қалып отыр.

1.5 Әдеби шолу бөлімі бойынша қорытынды

Бүгінгі күнге дейін бруцеллез дүние жүзінде кең таралған зооноздардың бірі ретінде қалып отыр. Индет мал өнімділігін айтарлықтай төмендетіп қана қоймай, сонымен қатар адам денсаулығына да үлкен қауіп төндіреді. Қазіргі таңда бруцеллез Таяу Шығыстың, Африканың, Оңтүстік және Орталық Американың, Оңтүстік және Орталық Азияның кейбір елдерінде, соның ішінде ҚР-да эндемикалық инфекция ретінде танылып отыр. Ауру малды дер кезінде және дәл анықтау бруцеллезбен күресудің маңызды элементі болып табылады.

ҚР-да сиыр және қой малының бруцеллезін диагностикалау үшін РБС, АР, КБР қолданылады. 2008 жылдан 2013 жылға дейінгі кезеңде індетке қарсы вакцинация және ауру малды анықтауда дәстүрлі серологиялық әдістерді қолдану тоқтатылып, коммерциялық ИФТ жинақтарының нәтижелеріне негізделген «сынақ және сою» (“test and slaughter”) әдісі қолданыста болды. Жаңа әдісті қолдану алғашқы бір жылдың ішінде бруцеллезге оң нәтиже берген сиыр малының санын орта есеппен алғанда 7,3 есеге өсіріп жіберді. Кейінгі 4-5 жыл аралығында да көптеген мал басы пышаққа ілінді, алайда эпизоотиялық-эпидемиялық жағдай шиеленіскен күйінде қала берді. Бұл деректерді ИФТ жинақтарында қолданылып жүрген *Brucella*-ның ЛПС-терінің тек ауру қоздырғышына ғана емес, сонымен қатар басқа да грам теріс

бактерияларға (полисахаридтік эпитоптарының ұқсатығына орай) қарсы бағытталған антиденелерді анықтауымен түсіндіруге болады. Яғни, жаңа әдіс біршама сау мал басына бруцеллезге шалдыққан деген жалған диагноз қоюға себепкер болды. Бұл оқиға бруцеллалардың ЛПС-теріне негізделген ИФТ-ды ауруды балау жұмыстарында қолдануға болмайтындығын үлкен мал шығынымен дәлелдеп берді. ИФТ өте сезімтал сыналым болғандықтан оны тек *Brucella* тұқымдасына тән (телімді) антиген болған жағдайда ғана қолдануға болатындығына әбден көз жеткізілді. Міне сондықтан да, бұл мәселе тек ҚР үшін ғана емес, бруцеллез эндемиялық індетке айналған басқа да елдердің ветеринария ғылымы үшін өте өзекті мәселеге айналып отыр.

Аталмыш мәселе шеңберінде заманауи әдеби көздеріне шолу бруцеллалардың апополисахаридті компоненттерінің арасында грам теріс бактериялармен айқыш-реакцияларды азайта алатын бірден-бір антигенді заттар - ақуыздар, соның ішінде СМА-дары екендігін көрсетіп отыр. Гендік инженерия жетістіктері патогендердің антигендерін дайындау және олардың жасуша өсінділерімен жұмыс істеу кезінде туындайтын қиындықтар мен биоқауіпті жағдайларды болдырмай, бруцелланың рекомбинантты рСМА-дарының диагностикалық құндылығын зерттеудің жаңа мүмкіндіктерін ашып отыр.

Жалқы рСМА-дарын ж-ИФТ-да пайдалану сыналымның жоғары телімділігін қамтамасыз етсе де, алайда оның сезімталдығына айтарлықтай кері әсерін тигізетіндігі айқын болды. *Brucella*-ның әртүрлі комбинациядағы құрама ақуыздарын қолдану серологиялық сыналымдардың сезімталдығының айтарлықтай өсуіне жағдай туғызды. Мысалы, рСМА-дар комбинациясына негізделген ж-ИФТ тышқандардың вирулентті *B. melitensis*-ке қарсы бағытталған антиденелерін вакцина штаммымен немесе бруцеллалармен антигендік ұқсастығы бар бактериялармен екпе алғаннан кейін пайда болған антиденелерден ажырата алаған. Алайда бұл нәтижелер, сиыр малында расталмады. Айталық, *Brucella abortus* 19 штаммымен ревакцинацияланған мал басында қоздырғыштың негізгі СМА-дарына тән антиденелер екпе алғаннан кейін 10 ай бойы анықталынатыны белгілі болды. Сиыр бруцеллезінің балауында да бруцеллалардың жекеленген рСМА-ына тән антиденелерді анықтау ИФТ-дың сезімталдығын төмендеткен. Бұл деректер вакцинация алдында індетке шалдыққан мал басын нақтырақ анықтау үшін *Brucella*-ның рСМА-ының комбинациясын ИФТ-да антиген ретінде қолданудың маңызы зор екендігін дәлелдеп отыр. Әрине, серологиялық сыналымдарда бірнеше рекомбинантты ақуыздарды қолдану оның өзіндік құнының өсуіне әкеледі. Бұл мәселені шешудің бірден-бір оңтайлы жолы - бірнеше ақуыздардың диагностикалық маңызды аймақтарын қамтитын бөліктерінен бір химерлі ақуыз жасау. Мұндай химерлі мультиэпитопты ақуызды бір штамм-өндіргіштен алу ИФТ-дың тек сезімталдылығын өсіріп қана қоймай, сонымен қатар сыналымның өзіндік құнының төмендеуіне де әкеледі.

2 ӨЗІНДІК ЗЕРТТЕУЛЕР

2.1 Зерттеу материалдары мен әдістері

Жұмыс «Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» КеАҚ-ның (ҚазАТУ) ветеринария және мал шаруашылығы технологиясы факультетінің "Ветеринариялық медицина" және "Микробиология және биотехнология" кафедраларында, ҚазАТУ ауыл шаруашылығы биотехнологиясының ғылыми-зерттеу платформасының "Инфекциялық аурулардың иммунодиагностикасы" және ҚР БҒМ Ғылым комитетінің "Ұлттық биотехнология орталығы" РМК-ның "Иммунохимия және иммунобиотехнология" зертханаларында 2018-2020 жылдарға арналған О. 0810 "Ауыл шаруашылығы мен ветеринарияға арналған жаңа препараттар мен инновациялық биотехнологияларды жасау" бағдарламасының шеңберіндегі "Құрама рекомбинантты антиген негізінде бруцеллездің серологиялық диагностикасы" (мемлекеттік тіркеу №:0118ҚР00970) атты ғылыми-техникалық жобаны жүзеге асыру кезеңінде орындалды.

2.1.1 Зерттеу материалдары

Зертханалық жануарлар

Жануарларға қатысты барлық іс-шаралар ҚазАТУ Ветеринария және мал шаруашылығы технологиясы факультетінің жануарлар этикасы жөніндегі комитетімен мақұлданды және «Жануарларды күтіп бағу бойынша нұсқаулар: зертханалық кеміргіштер мен қояндарға арналған түрлерге арналған ережелеріне» (Мемлекеттік стандарт, МемСТ 33216-2014) сәйкес жүргізілді. Зертханалық жануарлар ҚАТУ виварийінде жақсы гигиеналық жағдайда күтіп-бағылды, 12 сағаттық жарықпен, азық және сумен қалауынша қамтамасыз етілді. Температура ($22\pm 2^\circ\text{C}$) және ылғалдылық (55-60%) тәжірибе кезінде бір деңгейде сақталды.

Диссертациялық жұмыста зертханалық жануарлардың үш тобы пайдаланылды.

Бірінші топта 15 аутбредті ақ аталық тышқандар (8-10 апталық, дене салмағы 20-25 г) және кеңестік шиншилла тұқымының 12 аталық қояны (6 айлық, дене салмағы 3300г) болды. Бұл жануарлар *Brucella*-ның рекомбинантты сыртқы мембраналық және периплазмалық ақуыздарының, сондай-ақ қоздырғыштың табиғи ерігіш ақуыздарының салыстырмалы иммуногенділігі мен антигенділігін зерттеу үшін пайдаланылды.

Екінші топқа бруцеллалардың рСМА19, 25 және 31 ақуыздарының иммуногенділігін салыстырмалы түрде зерттеу үшін пайдаланылған 18 аталық тышқан (9-10 апталық, дене салмағы 20-25 г.) және кеңестік шиншилла тұқымының 2 аталық қояны (6 айлық, дене салмағы 3300 -3500 г.) енді.

Бруцелланың рСМА19+25, рСМА19+31 және рСМА25+31 мультипротеиндерінің иммуногенділігін зерттеу мақсатында 60 аутбредті аталық ақ тышқаннан (9-10 апталық, дене салмағы 20-25 г.) тұратын үшінші топтың жануарлары пайдаланылды.

Бактерия штаммдары және плазмидалар

B. abortus 19 жасушалары (Антиген, Алматы, Қазақстан) эритроцит агарында (Microgen, Махачкала, Ресей) өсірілді. Өсірілген дақылдың тазалығы, типтік өсуі тексеріліп, 0,5% фенол қосылған буферленген физиологиялық ерітінді (БФЕ) жуылды және бактерия жасушаларын инактивациялау үшін 37°C температураға реттелген инкубаторда 48 сағат ұсталды. Әрі қарай жасуша суспензиясы 30 минут бойы 5000 айн/мин режимінде центрифугалау арқылы үш рет жуылды.

Brucella тұқымдасының pCMA25, pCMA31[179], pBP26 [153] және pCu-ZnSOD [180] ақуыздарын өндіретін *Escherichia coli* BL21(DE3) штаммдары (Novagen, АҚШ) қолданылды.

Escherichia coli DH5 α және BL21 (DE3) (Novagen, АҚШ) штаммдары және pGEM-TEasy (Promega, Madison, АҚШ) және pET28 (Novagen, АҚШ) плазмидалары зерттеулерде *Brucella*-ның химерлік рекомбинантты ақуыздарын өндіретін штаммдарды алу үшін пайдаланылды. Жасуша өсінділері ампициллин және/немесе канамицин қосылған Луи Бертани (ЛБ) сұйық қоректік және ЛБтығыз қоректік орталарында (Thermo Fisher Scientific, Waltham, АҚШ) (тиісінше 100 және 50 мкг/мл) (Синтез, Курган, Ресей) өсірілді.

Бруцелланың pCMA19 [181], pCMA25 және pCMA31 [179] жекелеген ақуыздары мультипротеиндердің серологиялық әлеуетін (потенциалын) салыстырмалы зерттеу үшін қолданылды.

Brucella-ның pCu-ZnSOD және pBP26 рекомбинантты периплазмалық ақуыздарын ҚР Денсаулық сақтау министрлігі Ұлттық биотехнология орталығының аға ғылыми қызметкері С.З. Ескендинова табыс етті.

Сарысу үлгілері

Жұмыста жануарлардың 945 қан сарысуларынан тұратын төрт топтамасы пайдаланылды. Бірінші топтамада 327 ірі қараның қан сарысу болды. Оның ішінде:

- *B. abortus* 544 вирулентті штаммымен тәжірибе жүзінде жұқтырылған ірі қара малдың 12 қан сарысу үлгілері ҚР «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институтының» «Жұқпалы аурулардың алдын алу зертханасының» меңгерушісі, профессор Қ. Табыновпен табысталды;

- бруцеллездің жаңа эпизоотиялық ошақтарындағы індетке қарсы екпе алмаған серопозитивті сиырлардың 152 қан сарысуы ҚР АШМ «Ветеринария ұлттық референттік орталығының» коллекциясынан алынды. Бруцеллезден таза аймақ мәртебесіндегі «Мереке» шаруа қожалығының (Қарағанды облысы Бұқар жырау ауданы) ревакцинацияланған сиырларынан 151 қан сарысу сынамалары алынды. Бұл сиырлар 2015 жылы 5-6 айлық бұзау кезінде *B. abortus* 19 вакцинасының (Щелково биокомбинаты, Мәскеу облысы, Ресей) толық дозасымен (8×10^{10} жасуша) егілді және келесі үш жылда аталмыш препараттың 8×10^9 жасуша дозасымен реиммунизацияланды;

- бақылау (теріс) сарысу үлгілері ретінде вакцина егілмеген сиырлардан және РБС, АТ және КБР бойынша серонегативті 12 сарысу үлгілері қолданылды.

Бұл қан сарысулары ж-ИФТ-да бруцелланың жалқы сыртқы мембрана ақуыздарының (pCMA19, pCMA25 және pCMA31) антигенділігін зерттеу үшін пайдаланылды.

Екінші топтамада жалпы 154 сиыр малының қан сарысуы болды. Оның ішінде:

- 77 сарысу үлгілері жаңа індет ошағындағы (Қостанай облысы, Жетіқара ауданы) бруцеллезге РБС бойынша серопозитивті нәтижелері бар сиырлардан алынды;

- бруцеллезге оң нәтижелі 34 сиыр қан сарысулары ҚР АШМ «Ветеринария ұлттық референттік орталығынан» алынды;

- бруцеллезден таза шаруашылықта (Қарағанды облысы, Бұқар Жырау ауданы) вакцина алмаған және РБС және АР бойынша серонегативті сиыр малының 43 қан сарысуы бақылау үлгілері ретінде пайдаланылды.

Бұл қан сарысулары *Brucella*-ның pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+31 ақуыздарының антигенділігін зерттеу үшін пайдаланылды.

Үшінші топтама 426 қан сарысуынан тұрды. Оның тең жартысы сиырдан, қалғаны қойдан алынды. Оның ішінде:

- 88 сиыр (Ақмола облысы, Целиноград ауданы, Шалқар а/о) және 88 қой (Ақмола облысы, Қорғалжын ауданы, Сабынды а/о) сарысулары РБС және коммерциялық-ИФТ сыналымы (INgezim *Brucella* Compac 2.0, Испания) нәтижелеріне сәйкес бруцеллезге теріс реакция көрсеткен, вакцина алмаған және індеттен таза шаруашылықтың мал басынан алынды;

- бруцеллезге шалдыққан шаруашылықтарда екі (РБС және ж-ИФТ) немесе үш (РБС, КБР және ж-ИФТ) серологиялық сынамалар бойынша бруцеллезге оң нәтиже берген 50 сиырдың және 50 қойдың сарысу үлгілері;

- 75 сиыр және 75 қой сарысулары серологиялық нәтижесі белгісіз бруцеллез індетінің жаңа ошақтарындағы мал басына тиесілі болды.

Бұл қан сарысулары ж-ИФТ-да бруцеллалардың pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+31 ақуыздарының диагностикалық құнын дәстүрлі серологиялық сынақтармен салыстыра отыра бағалау мақсатында пайдаланылды.

Сарысулардың төртінші топтамасында 38 қан сарысу болды. Олардың 26-сы *B. abortus* RB-51 вакцинасымен бір ай бұрын егілген сиырларға (“Global Beef Products” ЖШС), 10-ы *B. abortus* 544 штаммымен тәжірибе түрінде жұқтырылған ірі қара малға (ҚР «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты») және 2-і бруцеллезге қарсы екпе алмаған бұқаларға (Қарағанды облысы, Бұқар Жырау ауданы) тиесілі болды.

Бұл сарысулар pCMA19+31 ақуызына негізделген ж-ИФТ диагностикалық құндылығын ҚР ветеринариялық препараттар тізілімінде тіркелген классикалық серологиялық реакциялармен (РБС, АР және КБР) және шетелдік *Brucella* LTFLOW-ИХТ-сыналыммен салыстыра отыра анықтау үшін пайдаланылды.

Барлық топтамалардағы қан сарысу үлгілері қолданылғанға дейін -20°C температурада сақталды.

2.1.2 Зерттеу әдістері

Генетикалық құрылымдарды жобалау

Brucella түрлерінің СМА19, СМА25 және СМА31 ақуыздарының ең иммунды-доминантты аймақтары Tibor et al. [182], Wergifosse et al. [183] және Vizcaino et al. [184] зерттеулерінің негізінде таңдалынып алынды.

Таңдалған ақуыздар фрагменттерінің аминқышқылдарының ретін іздеу АҚШ Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығы (NCBI) қарасты PubMed дерекқорларын (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) пайдалану арқылы жүргізілді. Биоинформатикалық талдау Vector NTI v.11.5 бағдарламалық пакетін қолдану арқылы іске асырылды (Invitrogen, АҚШ). Рекомбинантты ақуыздардың оңтайлы экспрессиясы үшін *E. coli* K12 жасушасына нуклеин қышқылы тізбегінің кодоны оңтайландырылды.

Гендердің нуклеотидтер тізбегі негізінде *Brucella*-ның рСМА19+25, рСМА19+31 және рСМА25+31 біріктірілген ақуыздарының синтезіне жауапты 3 химерлі генетикалық құрылым жасалынды.

Гендердің синтезі

Brucella-ның рСМА-дарының таңдалған фрагменттерінің гендері Macrogen фирмасымен (Сеул, Оңтүстік Корея) синтезделініп, әрбір ген 50 нг/мкл концентрациясында лиофилденген түрінде алынды. Әрбір генде рестрикция сайттары және 5'-соңында алты гистидин кодондары (6His-tag) болды.

Хемикомпетентті E. Coli DH5α жасушаларына трансформациясы. СМА кодтайтын синтезделген нуклеотидтер тізбегінің препараттық мөлшерін құру үшін алынған құрылымдар *E. coli DH5α* жасушаларына трансформацияланды. Ол үшін қажетті жасушалар 30 минут бойы мұзда ерітілді. Кейін 2 мкл (50-100 нг) плазмидтік ДНҚ қосылды және мұзда тағы 30 минут инкубацияланды. Содан кейін түтіктер 30 секундқа 42°C су моншасына, әрі қарай қайтадан мұзға 1-5 минутқа ауыстырылды. Алынған қоспаға 900 мкл 2X-ҮТ қоректік орта (1,6% бакто-триптон, 0,8% ашытқы сығындысы және 0,5% NaCl) қосылып, 37°C, 150 айн/мин 40-50 минут ішінде инкубацияланды. Инкубациядан кейін түтіктер бөлме температурасында 5 минут бойы 5000 айн/мин центрифугадан өткізілді. 80 мкл қалдырып, үстіңгі сұйық бөлігі алынып тасталды, қалған тұнбаны түбіндегі қоректік ортамен қайта суспензияланды және канамицин антибиотигі (50 мкг/мл) қосылған селективті қатты қоректік ортаға салынды. Петри табақшалары түнде 37°C температурада инкубацияланды.

Мультипротеинді рекомбинантты ақуыздарды клондау, экспрессиялау және тазарту

Үш геннің әрқайсысынан ДНҚ-ның препаративті мөлшерін алу үшін және олардың нуклеотидтер тізбегін анықтау мақсатында *E. coli DH5α* штаммы әрбір генмен трансформацияланды. ЛБ агарында өсірілген бактериялық жасушалар Тақ полимераза (Thermo Fisher Scientific Waltham, АҚШ) және M13 праймерлерінің (Promega, Medison, АҚШ) көмегімен полимеразды тізбекті реакция (ПТР) арқылы талданды. Оң клондар ДНҚ тазарту және секвенирлеу

үшін omega, Medison, АҚШ) көмегімен полимеразды тізбекті реакция (ПТР) арқылы Waltham, АҚШ) сиквенирлеу үшін қолданылды. Алынған гендер EcoRI және XhoI рестрикциялық орындары арқылы pET28 плазмидасына клондалды.

Енгізілген гендері бар pET-28 плазмидтік векторлары MicroPulser (Bio-Rad, АҚШ) құралының көмегімен компетентті *E. coli* BL21 (DE3) штаммына электропарация арқылы келесі шарттармен трансформацияланды: 2,5 кВ кернеу, 25 мкФ және 200 Ом жағдайында әрбір 50 мкл жасуша суспензиясына 100 нг плазида қосылды. Электропарацияның ұзақтығы 5,0 мс құрады.

Трансформацияланған жасушалар 950 мкл супероптималды ортада да (Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва) 37°C температурада 1 сағат аралығында 150 айн/мин шайқау арқылы инкубацияланды. Сонан соң 50 мкл жасуша суспензиясы құрамында канамицині бар ЛБ қоректік ортасына көшіріліп, 37°C температурада 16 сағат бойы өсірілді. Трансформанттардың жекеленген колониялары канамицині бар ЛБ сұйық қоректік ортасында өсірілді. Бактериялардың өсуінің логарифмдік фазасының ортасында ($\lambda=600$ нм, $OD_{600}=0,6$ абсорбция) қоректік ортаға 0,1 мМ индуктор -изопропил- β -D-1-тио-галактопиранозид (ИПТГ) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) қосылды. Өсінді ұдайы шайқау арқылы бөлме температурасында 16 сағат бойы инкубацияланды. Бактерия жасушалары 6000×g, 4°C, 7 мин режимінде центрифугалау арқылы жиналып алынды.

Бруцелланың рекомбинантты ақуыздарын өндіретін *E. coli* штамдары құрамында 1% бактотриптон, 0,5% ашытқы сығындысы (барлығы Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, АҚШ) және 100 мкг/мл концентрациясындағы ампициллин (Sintez, Курган, Ресей) мен 1% NaCl қоспасы бар ЛБ сұйық қоректік ортасының өсірілді. Бактериялардың логарифмдік өсу фазасының ортасында ($\lambda = 600$ нм, $OD 600$) рекомбинантты ақуыздар экспрессиясын индукциялау мақсатында соңғы концентрациясы 1 мМ болатындай изопропил β -D-1-тио-галактопиранозид (Sigma-Aldrich Сент-Луис, АҚШ) қосылды. Өсінді бөлме температурасында ұдайы шайқау арқылы 16 сағат бойы инкубацияланды. Ақырында бактериялық жасушалар 10 минут бойы 5000×g, 4 °C температура режимінде центрифугалау арқылы жиналып алынды. Осыдан кейін жасушалар лизис буферінде (20 мМ Tris, pH 7,5; 1 мМ EDTA; 100 мМ NaCl) жасушалардың 1 г ылғалды салмағына буфердің 10 мл мөлшерін қосу арқылы қайта суспензияланды, кейін соңғы концентрациясы 0,2 мМ болатын фенилметансульфонил фторидтің (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, АҚШ) 1 мкл қосылды.

Бактерия жасушаларын лизиске ұшырату және мақсатты ақуыздарды хроматографиялық жолмен тазарту

Бактерия жасушалары мұздай салқын буферде (20 мМ NaCl, 20 мМ HEPES және 0,1 мМ фенилметилсульфонил фторид, pH 7,5) импульстік режимде (секундына 10 импульс), 24 кГц жиілікте OmniRuptor 4000 ультрадыбыстық гомогенизатор (Omni International, Джорджия, АҚШ) көмегімен лизиске тартылды. Рекомбинантты ақуыздар 1 мл HisTrap™ HP

колонкасында (GE Healthcare, АҚШ) металл хелат хроматографиясы (Ni²⁺) арқылы тазартылды. Ол үшін рекомбинантты ақуыздары бар инклюзивті денешіктер центрифугалау арқылы жиналып, супернатант алынып тасталды. Шөгінді буферде ерітіліп (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, құрамында 8 M несеп нәр, 500 mM NaCl бар) және қайтадан ультрадыбыспен өңделді. Ерімейтін материал центрифугалау арқылы тұнбаға түсірілді және алынып тасталды. Ақуыз ерітіндісі никель-нитрилотри сірке қышқылы колонкасына (өткізгіш көлемі 2 мл) жүктелді және сол буфермен теңестірілді.

Колонка тепе-теңдік буферінің (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, құрамында 8 M несепнәр; 500 mM NaCl; 20 mM имидазол) 10 көлемімен жуылды. Сзықтық имидазол градиенті (20-500 mM) хроматографиялық бағандағы рекомбинантты ақуыздардың соңғы элюциясы үшін пайдаланылды. Ақуызды тазарту үшін афиндік хроматография қолданылды. Ақуыз фракциялары $\lambda = 280$ нм-де анықталды. Мақсатты ақуыздар пероксидазамен (HRP, Thermo Fisher Scientific) конъюгацияланған анти-His Tag тышқан моноклоналды антиденесі (MAb) арқылы, вестерн блоттинг әдісінде расталды.

B. abortus 19 штаммының бүтін жасушасына қарсы қоянның антисарысуын өндіру

Қоян белгілі әдісті қолдана отыра [186] *B. abortus 19* штаммының фенолмен өлтірілген жасушаларымен тері асты иммунизацияландырды. Құлақтың шеткі венасынан қан 0-ші күні (теріс бақылау ретінде), ал содан кейін қоянның антидене түзу жауабын бағалау үшін 14, 21, 35 және 45-ші күндері алынды. Гипериммунды сарысу 56-шы күні жиналып, қолданылғанға дейін -20°C температурада сақталды.

Натрий додецилсульфаты қосылған полиакриламид геліндегі (НДС-ПААГ) электрофорез және вестерн блоттинг

Бұл әдіс мақсатта қолданылды: 1) өнімнің өндіргіш-штаммның жасушасында бар екендігін анықтау үшін, 2) химерлік ақуыздардың *Brucella*-ның залалсыздандырылған (инактивирленген) және 3) вирулентті штаммдарына қарсы түзілген антиденелермен әрекеттесе алу қасиетін (антигенділігін) зерттеу үшін қолданылды.

Бірінші жұмыстың хаттамасы қысқаша қайырғанда келесі тәртіппен орындалды: өндіргіш-штаммның жасушасынан тазартылып алынған рСМА19+25, рСМА19+31 және рСМА25+31 ақуыздары 12% НДС-ПААГ-інде электрофорезге тартылды және ақуыз фракциялары нитроцеллюлоза мембранасына (GE Healthcare Life Sciences, Ұлыбритания) белгілі тәсілді қолдана отыра тасымалданды [185]. рСМА-дың жолақтары 1:4000 сұйылтынымдағы желкек пероксидазасымен (Thermo Fisher Scientific, Waltham, АҚШ) конъюгацияланған анти-His Tag моноклоналды антиденелердің көмегімен анықталды. Мембрана құрамында 0,05% твин-20 реагенті бар БФЕ-мен (БФЕ-Тв) жуылғаннан кейін, 4-хлор-1-нафтол субстратына (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) көшіріліп, ақуыз фракциялары боялғанша инкубацияланды. Реакцияны тоқтату үшін мембрана ионсыздандырылған суда жуылды.

Екінші жұмыста рСМА19+25, рСМА19+31 және/немесе рСМА25+31 ақуыздарының бруцеллалардың инактивирленген жасушаларына қарсы түзілген антиденелер үшін телімділігін анықтау мақсатында әуелі 12% НДС-ПААГ ақуыздарының электрофорезі жүргізілді. Электрофорезден кейін үлгілер нитроцеллюлоза мембранасына (GE Healthcare Life Sciences, Ұлыбритания) электр тогының 2 мА/см² тұрақты өрісінде арнайы буферді (25 мМ Tris-HCl, 192 мМ глицин және 20% метанол) қолдана отыра тасымалданды. Мембрананың бос бөліктері 1% сиыр сарысуы альбуминімен (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, МО, АҚШ) 4°C температурада 1 сағат бойы бұғатталып, үш ЗФР-Тв-мен жуылды, ал сонан соң 1:100 қатынасында сұйылтылған қоянның анти-*B. abortus*19 қан сарысуында 4°C температурада 2 сағат бойы ұсталды. Әрі қарай мембрана БФЕ-Тв-мен шайылып, ешкінің қоян иммуноглобулиндеріне қарсы желкек пероксидазасымен таңбаланған антиденелерінің ерітіндісінде (Jackson Immuno Research, Вест Гроув, АҚШ) 1 сағат бойы 4°C температурада инкубацияланып, БФЕ-Тв-мен жуылды. Ақуыз жолақтары 4-хлор-1-нафтол ерітіндісінде (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) боялды.

Үшінші жұмыс кезінде рСМА-дардың *Brucella*-ның тірі жасушаларына қарсы түзілген антиденелерге телімділігі *B. abortus* 544 штаммымен тәжірибелік түрде жұқтырылған құнажынан 28-ші күні алынған қан сарысуын қолдана отыра да тексерілді. ПААГ-інен нитроцеллюлоза мембранасына көшірілген ақуыздар қан сарысуының сұйылтылған ерітіндісінде (1:100) 2 сағат бойы 4°C температурада ұсталынды. Мембрана ЗФР-Тв-мен жуылып-шайылғаннан соң, қоянның сиыр IgG антиденелеріне қарсы (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) желкек пероксидазасымен таңбаланған антиденелерінің ерітіндісінде 4°C температурада 1 сағат бойы инкубацияланды. Ақуыз фракциялары 4-хлор-1-нафтол ерітіндісін (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) қолдана отырып айқындалды.

Бруцелланың ерігіш ақуыздарының препаратын (ЕАП) дайындау

B. abortus 19 тұтас жасушаларынан ЕАП-ын дайындау мембрана ақуыздарын құрамында 1 М натрий хлориді (Fisher Chemical, Loughborough, Ұлыбритания) және 0,1% Triton X-100 (Sigma-Oldrich) бар 0,1 М натрий цитратының ерітіндісімен (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, МО, АҚШ) элюцияға негізделген болды [100].

Ақуыздық антигендермен зертханалық тышқандарды иммундеу

Brucella рСМА19, 25 және 31, сондай-ақ қоздырғыштың ЕАП-ының иммуногенділігін салыстырмалы зерттеу үшін әрқайсысы 3 тышқаннан тұратын 5 топ қолданылды. Тышқандардың әрқайсысы тиісті ақуыздардың 25 мкг мөлшерімен иммунизацияланды: бірінші топқа рСМА25, екіншісіне рСМА31, үшіншісіне рСМА26, төртіншісіне рСОД және бесіншісіне *B. abortus*-тың ЕАП-ы инъекцияланды. Тышқандар келесі схема бойынша иммунизацияланды: 0-ші күні Фрейндтің толық емес адьювантында (Sigma-Aldrich) эмульсияланған тиісті антиген тері астына (т.а.) 100 мкл мөлшерінде енгізілді. 7-ші, 14-ші, 21-ші және 28-ші күндері БФЕ-інің (Amresco, Solon, OH,

АҚШ), рН 7,2–7,4, 200 мкл-індегі антиген құрсақ ішіне инъекцияланды. Сарысуларды бөліп алу үшін қан иммунизацияның 42-ші күні алынды. Әрбір иммундеу алдында қан үлгілері құйрық венасынан шыны түтіктерге (Isolab Laborgeräte GmbH - Wertheim, Германия) алынып, ж-ИФТ-ында антидене титрлері анықталды. Бақылау ретінде 0 күні иммундеу алдында қан сарысу үлгілері қолданылды.

Бруцелла ақуыздарына қарсы тышқанның антидене титрлерін ж-ИФТ әдісімен анықтау

Полистирол планшетінің ұяшықтары (Thermo Fisher Scientific, Waltham, АҚШ) иммунизацияда қолданылған ақуыздардың - рСМА19, рСМА25, рСМА31, рCu-ZnSOD, рBP26 және ЕАП-тың бикарбонатты буфердегі (рН 9,6) 5,0 мкг/мл мөлшерлерінде түні бойы 4°C қапталды. Сонан соң планшет ұяшықтары БФЕ-Тв-мен үш рет қатарынан шайылды. Ұяшықтың бұғатталмаған орындары сиыр қансарысуы альбуминінің 1% ерітіндісімен инактивацияланды. Осыдан кейін планшеттің 8 ұяшықтарында гомологиялық және гетерологиялық антиқансарысуларының сұйылтылымдары (1:100-ден бастап) дайындалып 37°C температурада 1 сағат ұсталынды. Жуып-шаю процедурасынан кейін кейін ұяшықтарға БФЕ-Тв-мен сұйылтылған тышқан IgG-деріне қарсы желкек пероксидазасымен таңбаланған антиденелер (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) қосылды. Планшет 1 сағ (37°C) инкубацияланып, әр ұяшықтарға О-фенилендиамин (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) субстраты қосылды. Планшет бөлме температурасында қараңғы жағдайда ұсталып, 3-5 мин соң ұяшықтарына бірдей мөлшерде 2М күкірт қышқылы қосылды. Абсорбция көрсеткіштері 492 нм диапозонында оптикалық тығыздықты есептеу құрылғысының (Bio-Rad 680, Редмонд, WA, АҚШ) көмегімен өлшенді. Антиденелердің титрі ретінде оптикалық тығыздығы (ОТ) негативті қан сарысуының 1:100 сұйылтынымдағы ОТ-ның көрсеткішінен екі немесе одан да көп есе асып түсетін сұйылтынымы алынды.

Brucella-ның рСМА19-мен тышқандарды иммундеу

Brucella-ның рСМА19-ның антидене түзу қабілетін зерттеу үшін әрқайсысы 3 тышқаннан тұратын 6 топ пайдаланылды. II, III және V топтағы жануарлар рСМА19 ақуызының БФЕ-індегі (рН 7,2–7,4), Фрейдтің толымсыз (ТеФА) және/немесе Фрейдтің толық адьювантындағы (ТФА) (Sigma-Oldrich, Сент-Луис, АҚШ) ерітінділерімен бір рет тері астына (т.а.) тиісінше иммунизацияланды. IV топ 0-ші және 14-ші күндері ТеФА-мен және/немесе БФЕ-сімен араласқан ақуызбен тиісінше екі рет иммунделді. VI топ 0-ші, 14-ші және 21-ші күндері келесу сұлбаға сәйкес үш рет егілді: рСМА19+ТФА, рСМА19+ТеФА және/немесе рСМА19+БФЕ. Тышқандар әрқайсысы ақуыздың 25 мкг егілді. I топтағы тышқандарға бір рет тек қана ТФА инъекцияланды. II, III және V топтағы тышқандардың қан үлгілері құйрық венасынан 21-ші күні, ал IV, VI топ жануарларынан 28-ші күні алынып, ж-ИФТ-ында рСМА19-ға және сонымен қатар рСМА25 пен рСМА31-ге қарсы антиденелердің титрлері анықталды. I топтың тышқандарынан 21-ші күні алынған сарысулардың

қолданылған рСМА-ға қатынасты белсенділігі тексерілді. Бақылау ретінде 0-ші күні иммундеу алдында алынған қан сарысулары пайдаланылды.

рСМА19-ға қарсы тышқан антиқансарысуларының өзіне және рСМА25 пен рСМА31-ге қарсы титрлерін ж-ИФТ-ында анықтау

Бұл әдіс жоғарыда жазылған бруцелла ақуыздарына қарсы тышқанның антидене титрлерін ж-ИФТ-да анықтау сұлбасы бойынша орындалды. Талдаудың шекті мәнін (cut off value) иммендеуге дейін 18 тышқаннан алынған қан сарысуларының орташа ОТ-ына оның 3 еселенген ауытқуын қосу арқылы анықтадық.

ИФТ әдісімен рекомбинантты жалқы ақуыздардың антигенділігін анықтау

Полистирол планшетінің ұяшықтары рСМА19, рСМА25 және/немесе рСМА31 ақуыздарымен жоғарыда сипатталған әдіске сәйкес қапталды. Әрбір ақуызмен қапталған 8 ұяшықтарда *B. abortus* 19 жасушаларына қарсы алынған қоян сарысуының және/немесе бруцеллезге оң нәтижелі сиыр сарысуларының БФЕ-Тв-де 1:100-ден бастап сұйылтылымдары дайындалып, планшетті 37°C температурада 1 сағат ұсталды. Антигендермен байланысқан антиденелердің мөлшері қоян (Jackson ImmunoResearch, West Grove, АҚШ) және/немесе сиыр иммуноглобулиндеріне (Sigma-Oldrich, Сент-Луис, АҚШ) қарсы желкек пероксидазасымен таңбаланған антиденелердің көмегімен анықталды.

Қоян антиденелердің титрі ретінде оптикалық тығыздығы (ОТ) негативті қан сарысуының 1:100 сұйылтынымындағы ОТ-ның көрсеткішінен екі немесе одан да көп есе асып түсетін сұйылтынымы алынды.

Сиыр малы қан сарысуының ж-ИФТ-дағы шекті мәнін анықтау үшін *B. abortus*-қа теріс нәтиже берген 12 бақылау сарысуының ОТ-ның орташа көрсеткіші анықталды. Зерттеуге алынған қан сарысуының ОТ (ОТз) бақылау (негативті) қан сарысуының 1:100 сұйылтынымдағы ОТ-ның көрсеткішінен (ОТб) екі немесе одан да көп есе асып түссе, ж-ИФТ-дың нәтижесі оң болып саналды.

Мультипротейндердің антигенділігін Brucella-ға қарсы алынған қан сарысуын қолдана отыра ж-ИФТ-да анықтау

Полистирол планшетінің (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) ұяшықтарыбикарбонат буферінде (рН 9,6)1,0 мкг/мл мөлшерінде ерітілген рСМА19+31, рСМА19+25 және рСМА25+31 ақуыздарымен түні бойы 4°C температурада сенсбилизацияланды. *B. abortus* 19 штаммының фенолмен инактивирленген тұтас жасушаларына қарсы алынған қоян сарысуының және/немесе бруцеллезге оң және/немесе *B. abortus* 544-пен тәжірибелік түрде жұқтырған сиыр малының сарысу үлгілерінің ақуыздармен қапталған сегіз ұяшықтарда БФЕ-Тв-де 1:100-ден бастап сұйылтылымдары жасалып, планшет 37°C температурада 1 сағат бойы ұсталды. Антитүрлік антиденелер ретінде ешкінің қоян IgG-іне (Jackson Immuno Research, West Grove, АҚШ) және/немесе қоянның сиыр IgG-іне қарсы (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) желкек пероксидазасымен таңбаланған антиденелері қолданылды. Қоян қан сарысуының ОТ бақылау қан сарысуының 1:100 сұйылтынымдағы ОТ-ның

көрсеткішінен екі немесе одан да көп есе асып түссе, ж-ИФТ нәтижесі оң болып саналды. Сиыр қан сарысуларына арналған ИФТ-дың шектік мәні ретінде *B. abortus*-негативті сарысуының (n=43) 1:200 сұйылтынымындағы орташа ОТ мәнінен (492 нм) екі есе жоғары көрсеткіш алынды.

Brucella-ның химерлі рСМА-ына қарсытышқан қан сарысуларын алу

10 тышқаннан тұратын үш топтың жануарларына рСМА19+25, рСМА19+31 және/немесе рСМА25+31 ақуыздарының 25 мкг екі рет тері астына егілді. 0-ші күні ФТеА (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Германия) және 14-ші күні БФЕ (рН 7,2-7,4) аталмыш иммуногендермен бірдей мөлшерде араластырылды. 28-ші күні құйрық венасынан қан алынып, центрифугалаудан кейін бөлінген сарысулардың ИФТ-да пайдаланылған иммуногендерге, сондай-ақ жалқы ақуыздарға (рСМА19, рСМА25 және/немесе рСМА31) қарсы титрлері анықталды. Теріс бақылау ретінде ешқандай инъекция алмаған 10 тышқанның қан сарысулары қолданылды.

Brucella-ның жалқы рСМА-дарына қарсы тышқан қан сарысуын алу. Бұл мақсатта әрқайсысы 5 тышқаннан тұратын 3 топ пайдаланылды. Олар рСМА19 (I топ), рСМА25 (II топ) және рСМА31 (III топ) ақуыздарымен жоғарыда жазылған сұлбаға сәйкес иммунделді. Бақылау ретінде ешқандай екпе алмаған бес тышқанның қан сарысулары пайдаланылды.

Химерлі ақуыздардың антигенділігін ИФТ-ында Brucella-ның жалқы рСМА-дарына қарсы алынған сарысуларды қолдана отыра анықтау

Полистирол планшетінің ұяшықтары мультипротеиндермен жоғарыда жазылғандай қапталды және анти-рСМА19, 25 және 31 сарысуларының ұяшықтарда тиісті сұйылтымдары дайындалды. Одан кейін, антигендермен байланысқан антиденелер қоянның тышқан IgG-іне қарсы желкек пероксидазасымен таңбаланған антиденелерімен (Sigma-Oldrich, Сент-Луис, МО, АҚШ) анықталды. Талдаудың шекті мәнін (cut off value) имменделмеген 5 тышқаннан алынған қан сарысуларының 1:100 сұйылтымының орташа ОТ-ына оның 3 еселенген ауытқуын қосу арқылы анықтадық.

Жалқы ақуыздардың антигенділігін ИФТ-ында Brucella-ның мультипротеинді рСМА-дарына қарсы алынған сарысуларды қолдана отыра анықтау

Қысқаша қайтарғанда, планшет рСМА 19, 25 және/немесе 31 ақуыздарымен сенсублизацияланып, *Brucella*-ның химерлі рСМА-дарына қарсы алынған тышқан сарысуларының ұяшықтарда жоғарыда жазылған тәртіппен сұйылтымдары дайындалды. Талдаудың шекті мәнін (cut off value) имменделмеген 10 тышқаннан алынған қан сарысуларының 1:100 сұйылтымының орташа ОТ-ына оның 3 еселенген ауытқуын қосу арқылы анықтадық. Барлық талдаулар үш рет жүргізіліп, үш рет қайталанды.

Роз-Бенгал сынамасының қойылымы. Сиыр және/немес қой қан сарысуының үлгілері Мемлекет аралық стандартқа (МЕМСТ 34105-2017) сәйкес РБС әдісімен бруцеллезге зерттелген болатын. Бұл әдіске прозона феноменінің алдын алу мақсатында модификация енгіздік. Қысқаша қайтарғанда, РБС келесі протокол бойынша орындалды. Ақ эмальданған

пластинаның құрғақ ұяшығына 30 мкл сұйылтылмаған қан сарысуы тамшыланды. Келесі 4 ұяшықтардың әрқайсына бір тамшы көлемінде (30 мкл) БФЕ тамызылды да, олардың біріншісіне 1:2 сұйылтуды алу үшін бірдей көлемдегі сұйылтылмаған қан сарысу қосылып, араластырылынды. Сонан соң бұл қоспа келесі 3 ұяшықтарда екі еселенген сұйылтымдарды дайындау үшін қолданылды (сарысу сұйылтулары тиісінше 1:4, 1:8 және 1:16). Содан кейін ұяшықтардағы сұйылтылмаған және сұйылтылған қан сарысуларының жанына РБС-антигеннің (*B. abortus* S99, «Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорны, Алматы, Қазақстан) тең көлемі тамшыланды да, антиген мен қан сарысу үлгілері бір-бірімен араластырылып, соңғыларының 1:2-ден 1:32-ге дейінгі диапазонда сұйылтулары алынды. Пластина шайқағышта 4 мин. бойы ақырын шайқалынылды. Мөлшерлері әртүрлі қызғылт үлпек түріндегі агглютинат пайда болған жағдайда нәтиже оң деп саналды, ал агглютинация болмаған жағдайда реакция теріс деп саналды. Серологиялық сынақтан бұрын РБС антигені оң және теріс агглютинациялаушы сарысулар арқылы бақыланды. Антигенді спонтанды агглютинацияға тексеру мақсатында оның 30 мкл-іне БФЕ-нің бірдей көлемі қосылды.

ИФТ-ында сиыр және/немесе қой сарысу үлгілерін серологиялық зерттеу

Полистирол планшетінің ұяшықтары бикарбонатты буфердегі (рН 9,6), концентрациялары 1,0 мкг/мл болатын рСМА19+25, рСМА19+31 және/немесе рСМА25+31 ақуыздары түні бойы 4°С температураға реттелген тоңазытқыш ішінде қалдырылды. Ұяшықтар БФЕ-Тв-де 1:100 қатынасында сұйылтылған сиыр және/немесе қой малы сарысуларымен толтырылып, планшет 37°С температурада 1 сағат бойы ұсталды. Антитүрлік антиденелер ретінде қоянның сиыр IgG-деріне (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) және/немесе есектің қой IgG-деріне (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) қарсы желкек пероксидазасымен таңбаланған антиденелер қолданылды. ж-ИФТ-дың шектік мәндерін сау сиырлардың (n=88) және/немесе қойлардың (n=88) 1:100 сұйылтымдағы қан сарысуларының орташа ОТ-ына оның 3 еселенген ауытқуын қосу арқылы анықтадық. Барлық талдаулар 3 рет жүргізіліп, әрбір үлгі 3 рет тексерілді.

Статистикалық талдау

ОТ₃/ОТ₆ орташа мәндері арасында статистикалық салыстырулар жасау үшін бір жақты ANOVA дисперсиялық талдауы пайдаланылды. Антидене титрлерін статистикалық талдау Т.Сайдулдинның әдісі бойынша жүргізілді [188]. Нәтижелер 0,05-тен төмен ықтималдық деңгейінде маңызды деп саналды.

2.2 Өзіндік зерттеу нәтижелері

2.2.1 Қазақстан Республикасындағы бруцеллез бойынша эпизоотиялық жағдайдың қысқаша сипаттамасы және аурудың серодиагностикасы

Бруцеллез, әлемдегі ең көп таралған зооноздардың бірі ретінде, мал шаруашылығына айтарлықтай экономикалық зиян келтіретін аса қауіпті және әлеуметтік маңызы бар инфекция болып табылады. Қазіргі таңда әлемнің тек 17 елі ғана ДДҰ-ға өздерінің бруцеллезден таза екенін хабарлады [189]. Жер бетінде жыл сайын бруцеллез ауруына 500 000-нан астам адам шалдығады, ал

оның 40%-ы (195 000) Шығыс Жерорта теңізі аймағында тұратын тұрғындардың үлесіне тиеді. 100 мың тұрғынға шаққанда бруцеллез ауруының ең жоғары көрсеткіштері Сирияда – 160.3, Иракта – 27.8, Түркияда – 26.2, Иранда – 23.9, Сауд Арабиясында-21.4 тіркелініп отыр. Шығыс Еуропа елдерінде 1000 мың адамға шаққанда бұл көрсеткіш 2.1-ден 6.4-ке дейін аралықта болса, ал Македония Республикасында 14.8-ге жеткен.

Орталық Азия елдерінің аталмыш көрсеткіштері әлемдік деңгейден әлдеқайда жоғары. Айталық, Қазақстанның және Қырғызстанның 100 мың тұрғындарының арасында тиісінше 11.6 және 36 адам бруцеллез ауруын жұқтырған. Индет деңгейі салыстырмалы түрде тек Өзбекстанда ғана төменірек (1.8). 100 000 тұрғынға шаққанда адамдардың бруцеллезбен ауыру көрсеткіштері Ресей Федерациясында – 0.41, Грецияда – 2.1, Германияда және Ұлыбритания Біріккен Корольдігі мен Солтүстік Ирландия – 0,03 және Канадада – 0,009-ды құрап отыр. Айта кететін жағдай - адамдардың бруцеллезбен ауыруы әрдайым тиісті дәрежеде тіркелмейді [2]. Дегенмен, бірқатар мемлекеттер, әсіресе Еуропа елдері (Англия, Дания, Германия, Финляндия, Швеция, Норвегия, Швейцария, Чехия, Словакия, Румыния), сондай-ақ Жапония мал мен адамдар арасында бұл ауруды толығымен жоюға қол жеткізді. Бруцеллезбен күрес Болгарияда, бұрынғы Югославия мемлекеттерінде табысты жүргізілуде. Бұл елдердің жекелеген өңірлерінде бірін-саран бруцеллез ауруы тіркелген [190].

Жалпы қабылданған заманауи классификацияға сәйкес, *Brucella* тұқымына 10 түр және қоздырғыштардың бірнеше биотиптері кіреді [191]. Мұндай жіктелу табиғатта бруцелланың белгілі бір түрінің табиғи қожайындарының жеткілікті деңгейде болуымен түсіндіріледі. XX ғасырдың екінші жартысында ерекше табиғи икемділіктің арқасында бруцеллездің қоздырғышы көптеген сүтқоректілерге, сондай-ақ балықтарға, қосмекенділер мен бауырымен жорғалаушыларға зардапты болып келетіндігі дәлелденді [192]. Бұл феномен соңғы онжылдықтарда байқалған бруцеллалардың тоғышарлық аймағының кеңеюіне себеп болады және осы микроорганизмнің жіктелуін ұдайы толықтырып тұруды қажет етеді. Эпидемиологиялық және клиникалық тұрғыдан адамның жұқпалы патологиясында патогеннің мына үш түрі: *B. melitensis*, *B. abortus* және *B. suis* маңызды екендігі дәлелденді [193]. *B. canis* белгілі бір жағдайларда адамның ауруын тудыруы мүмкін, алайда иттердің бруцеллезбен ауруы деңгейі жоғары аймақтардың өзінде бұл қоздырғыш адамға қауіпті емес. Адамдар *B. ceti* және *B. pinnipedialis*-пен жұқтырылған итбалықтар мен және киттермен кәсіби байланыста болу арқылы бруцеллезге шалдығуы мүмкін [194].

ҚР-да соңғы жылдары бруцеллез бойынша эпизоотиялық жағдайдың жақсару үрдісі байқалмайды. Республиканың көптеген қалыптасқан эпизоотиялық қолайсыз жағдайларға және мал шаруашылығындағы ветеринариялық-санитариялық және гигиеналық нормалар мен ережелердің сақталмауына байланысты бруцеллез кең таралған индет болып қалуда. Бруцеллез мал шаруашылығындағы экономикалық шығынның негізгі себебі

ғана емес, сонымен қатар адамның денсаулығына да үлкен зиян келтіріп, еңбек қабілетсіздігіне және мүгедектікке әкелетін бірден-бір зоонозды ауру [195].

Эксперименттік деректер әртүрлі эпизоотологиялық-эпидемиологиялық сипаттамасы бар бруцеллез ошақтарынан бөлініп алынған бруцеллалардың түрлері мен биоварларының әртүрлілігін көрсетеді. Эпидемиологиялық деректерді талдау адамдардың бруцеллезбен сырқаттануы ауыл шаруашылығы жануарлары арасында осы аурудың эпизоотиясымен тікелей байланысты екенін көрсетеді. Ауыл шаруашылығы малдарының арасында бруцеллездің пайда болуы мен таралуының негізгі себептері бруцеллезге қарсы тиісті іс-шараларды жүргізбестен жануарларды рұқсатсыз сатып алу және басқа өңірлерден әкелу, мал басының тіркелуі мен орынын ауыстырудың муниципалдық органдар тарапынан тиісті бақылаудың болмауы, ауру малды союға уақытылы тапсырмау, ауру малдар мен сау табынды бірге бағу болып табылады [196].

2018-2020 жылдарға арналған "Ветеринариялық салауаттылық пен азық-түлік қауіпсіздігін ғылыми қамтамасыз ету" ғылыми бағдарламасы аясында Қазақ ветеринарлық ғылыми-зерттеу институтының (ҚазҒЗВИ) зерттеу нәтижелеріне сәйкес [3], ҚР-да 2016-2019 жылдар аралығында сиыр малының бруцеллезге шалдығу деңгейі 0,4-0,5% аралығында болды. 2016-2019 жылдары сиыр малының бруцеллезге шалдығу деңгейінің жоғарғы көрсеткіштері БҚО-да 1,1%; 1,3%; 1,3%; 1,0%; Павлодар облысында: 0,8%; 1,1%; 1,2%, 0,7% ШҚО-да: 0,5;0,8; 0,8 және 0,9% тіркелді. 2020 жылдың алғашқы 6 айында бруцеллезге оң нәтиже берген сиыр малының басы 0,37%-ға тең болды, оның ішінде індеттің жоғары көрсеткіштері ШҚО (1,2%), БҚО, Ақтөбе және Қарағанды (0,8%) және Павлодар облыстарында (0,63%) байқалды. 2017-2019 жылдары ҚР-да ІҚМ-дың 110 761-і бруцеллезбен ауру санатындағы мал ретінде етке тапсырылып, еліміздің мал шаруашылығына айтарлықтай экономикалық залал келтірді. Аталмыш уақыт аралығында ІҚМ-дың індетке ұшырау көрсеткіштері мына келесі облыстарда: ШҚО-ында (1,18%); БҚО-ында (1,17%); Павлодар (0,81%); Қарағанды (0,65%); Қостанай (0,59%) және Ақтөбе (0,58%) облыстарында орташа республикалық деңгейден (0,45%) жоғарырақ болды.

Сиыр малының бруцеллезбен ҚР және жекеленген облыстар бойынша орташа ауру көрсеткіштерін ел аумағын 3 аймаққа бөлінген (1-ші сурет).



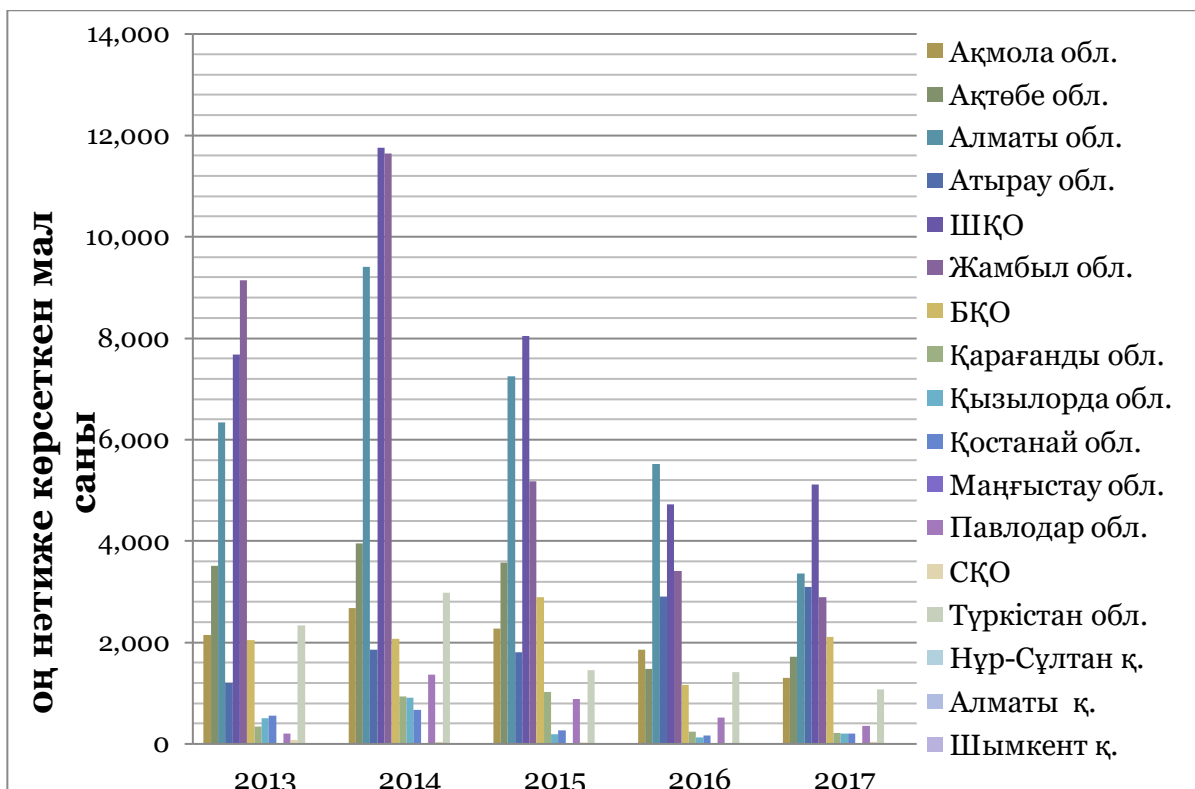
Жоғары таралу – БҚО, ШҚО, Павлодар, Қостанай, Ақтөбе, Қарағанды
Орташа таралу – Ақмола және Атырауда
Сирек таралу – СҚО, Жамбыл және Алматы облыстары
Бруцеллезден таза аймақ – Маңғыстау, Қызылорда және Түркістан облыстары

1-ші сурет - 2017-2019 жылдарға сиыр малының бруцеллезге шалдығуы бойынша ҚР облыстарының аймақтарға бөлінуі

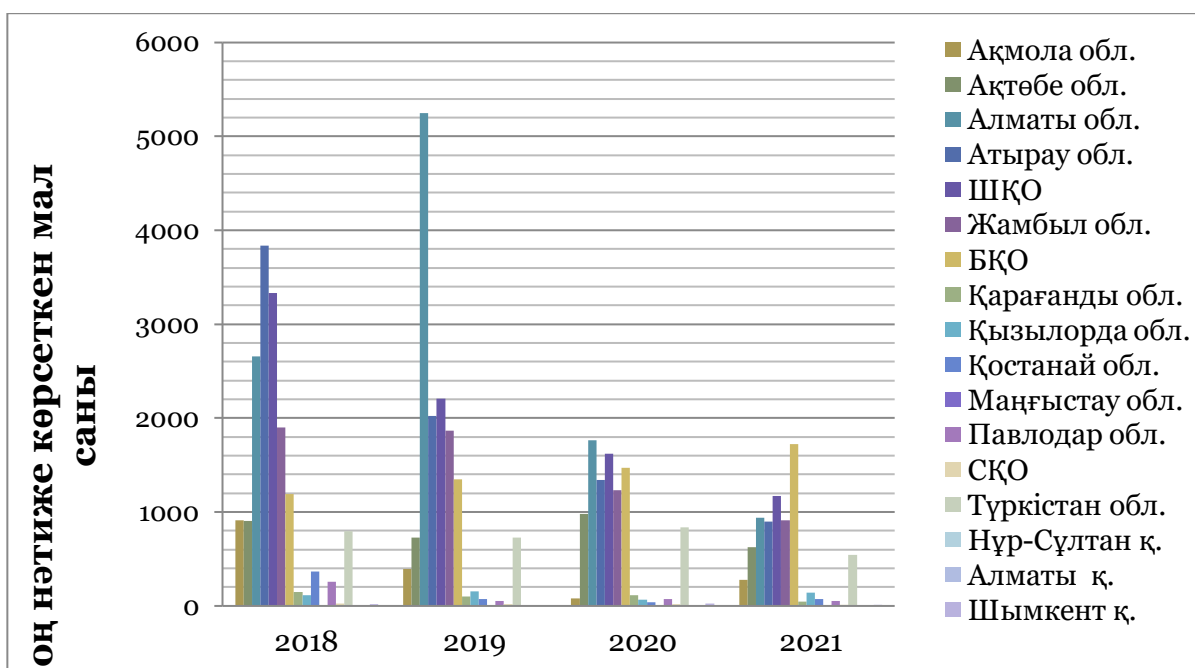
Сиыр бруцеллезінің жоғарғы таралу аймағына БҚО (1,17%), ШҚО (1,18%), Павлодар (0,81%), Қостанай (0,59%), Ақтөбе (0,58%), Қарағанды (0,65%) облыстары жатқызылған. Бұл облыстар ҚР аумағының 42,8% алып жатыр. Ел аумағының 14,3%-ын алып жатқан Ақмола (0,36%) және Атырау облыстарында (0,45%) індет орташа деңгейде таралған, ал СҚО (0,18%), Жамбыл (0,09%) және Алматы облыстарында (0,12%) сиыр бруцеллезінің таралуы төмен деңгейде деп танылған. Індеттен сау аймақтарға Маңғыстау (0,0%), Қызылорда (0,02%) және Түркістан облыстары (0,04%) енгізілген. Соңғы екі аймақ еліміздің 42,8%-ын тең көлемде алып жатыр.

Кейінгі 9 жыл аралығында (2013-2021 жж.) елімізде қой басының көбеюіне байланысты бруцеллез ауруына дәстүрлік серологиялық реакциялармен тексерілген мал басының саны да өсіп отыр. ҚР АШМ Ветеринариялық бақылау және қадағалау комитетінің деректеріне сүйенсек, алғашқы 3 жыл кезеңінде қой бруцеллезіне 17 285 738, 15 428 206 және 17 120 312 бас тексерілсе, кейінгі 3 жылда 22 648 182, 24 451 299 және 26 449 107, ал соңғы 3 жылда 22 587 669, 22 805 424 және 23 095 146 қой бруцеллезге серологиялық тексерістен өткізілген (Е-Қосымшасы).

Осы мерзім аралығында бруцеллезге дәстүрлі серологиялық реакциялар бойынша оң нәтиже берген қой саны диаграмма ретінде 2-ші және 3-ші суреттерде көрсетілген.



2-ші сурет – 2013-2017 жж. ҚР-ында бруцеллезге оң нәтиже көрсеткен қой саны



3-ші сурет– 2018-2021 жж. ҚР-ында бруцеллезге оң нәтиже көрсеткен қой саны

Егер алғашқы 3 жылда (2013-2015 жж.) індет жұқтыру деңгейі 0,20-0,33% болса, кейінгі 3 жылда (2016-2018 жж.) бұл көрсеткіш 0,06-0,10%-ға дейін, ал

соңғы жылдары (2019-2021 жж.) 0,07%-дан 0,03%-ға дейін төмендеген. Аталмыш мерзімдер аралығында тиісінше 121 255, 61 701 және 32 047 қой (барлығы 215 003 бас) ауру мал ретінде пышаққа ілінген.

2013-2015 жж. қойлардың індетке шалдығу деңгейі Ақмола (0,45%; 0,61%; 0,48%), Ақтөбе (0,48%; 0,34%), Алматы (0,41%), Атырау (0,34%) ШҚО (0,42%; 0,72%; 0,35%) және Жамбыл (0,46%; 0,60%) облыстарында орта көрсеткіштерден жоғары болған. 2016-2018 жж. бұл облыстарда қойлардың індет жұқтыру деңгейі төмендесе де, республикалық орта көрсеткіштерден (РОК) жоғары болды (0,06%-0,10%), ал Ақтөбе, Алматы және Жамбыл облыстарында 2018 ж. бруцеллезге оң нәтиже берген малдың салыстырмалы саны РОК-тен төменірек болды. Алайда соңғы 3 жылда Ақтөбе және Алматы облыстарында қойлардың індет жұқтыру деңгейі тағы да РОК-тен жоғарылай бастады, ал Атырау және ШҚО эпизоотиялық ахуал салыстырмалы түрде күрделірек күйінде қалып отыр. Алдыңғы 6 жылда қой бруцеллезі кеңірек таралған аумаққа жатқызылмаған БҚО-ында кейінгі 3 жылда малдың бруцеллезге шалдығу деңгейі РОК-тен (0,03%-0,07%) біршама жоғары болды (0,10%-0,12%).

Көңіл аударатын мәселе – Алматы қаласында қойлардың бруцеллезге шалдығу деңгейінің РОК-термен салыстырғана анағұрлым жоғары болуы. Айталық, 2015-2021 жж РОК 0,09%-ға тең болса, Алматы қаласында зерттелген қойлардың 0,34%-ы бруцеллез ауруына оң нәтиже көрсеткен. Республикалық статусы бар Шымкент және Түркістан қалаларында да қой бруцеллезі тіркеліп отыр.

Талдау жасап отырған жылдары қой бруцеллезінен таза аймақтарға Маңғыстау облысы мен Астана қаласы ғана танылып отыр. Қой бруцеллезі СҚО-ында 2017-2018 жж. тексерілген малдың тек 0,003%-0,01% ғана анықталған. Ал, аталмыш індеттің орта деңгейде таралған аймақтарына Қарағанды, Қостанай және Павлодар облыстарын жатқызуға болады (4-ші сурет).



4-ші сурет - ҚР-ның қой бруцеллезі бойынша 2021 жж. эпизоотиялық жағдайы

4-ші суреттен көрініп тұрғандай, 2021 ж. қалыптасқан эпизоотиялық ахуалға қарай ел аумағын үш аймаққа бөлуге болады. Индеттен сау аймақтарға Маңғыстау облысы және Астана қаласы, ал қойдың бруцеллезбен жұқтырылу деңгейі 0,03% -дан асатын өңірлерге Ақмола, Ақтөбе, Жамбыл, Шығыс Қазақстан облыстары және Алматы қаласы еніп отыр. Қалған аймақтарда аталмыш көрсеткіш $\leq 0,01\% - 0,029\%$ қалып отыр.

Бруцеллезбен күресудің тиімділігі, ең алдымен, ауру малды уақтылы анықтап, оны дер кезінде оқшаулауға байланысты. Бруцеллездің негізі диагностикасы болып саналатын болып серологиялық балауда әр түрлі реакциялар қолданылады, алайда олардың екеуі, атап айтсақ АР және КБР кеңіне қолданыс тауып отыр. Реакциялардың алғашқысы малға жаппай скрининг жүргізу мақсатында, ал соңғысы – оның нәтижелерін растау үшін [197].

Соңғы уақыттарда диагностикалық тәжірибеде ИФТ-ды қолдануға негізделген сыналым жүйелері қолданыла бастады. ИФТ-дың тартымдылығы сыналымның жоғары сезімталдығымен және оның қолдануын автоматтандыру мүмкіндіктерімен түсіндіріледі [198]. Алайда, ветеринарлық препараттар нарығындағы бруцеллезді диагностикалауға арналған ИФТ-сыналымдар, сондай-ақ классикалық реакциялар да бруцеллалардың S -ЛПС-теріне немесе патогеннің тұтас жасушаларына қарсы антиденелерді анықтауға негізделгендіктен жалған оң нәтижелер беруі әбден мүмкін [26, 199].

Бруцеллалардың S-ЛПС-теріне бағытталған антиденелердің басқа клиникалық маңызы бар грам-теріс бактериялармен айқас реакцияларға түсе алатындығы бүгінгі күні жан-жақты дәлелденген құбылыс [200]. Сонымен қатар, бүгінгі таңдағы серодиагностика сыналымдары бруцеллезге қарсы вакцинацияланған малды ауруды жұқтырғандардан ажыратуға мүмкіндік бермей отыр [26, 201,202]. Алайда, бруцеллалардың S-ЛПС антигенін алу технологиясының салыстырмалы жеңілдігі дәстүрлі диагностикалар мен ИФТ-сыналымдарын өндірушілер үшін экономикалық тұрғыдан алғанда тартымды фактор болып отыр.

ҚР-да ИФТ диагностикалық практикаға 2008 жылдан бастап енгізіле басталды. Бір жыл ішінде барлық сиыр мал басы тек коммерциялық ИФТ-сыналымымен зерттелетін болды және малға вакцинация жасау тоқтатылып, бруцеллезге қарсы күрестің негізгі әдісі - ИФТ нәтижелері бойынша оң нәтиже берген малды сою болып табылды. Қазақстанда қолданылатын ИФТ диагностикалық жинақтарында ("Бицентр";" Нарвак "ҮЕҰ;" Prionics AG";" Svanova";" Ingenasa";" ID VET";" Sinbyotics; Veterinary Laboratories Agency") бруцелланың антигені ретінде ЛПС-і қолданылды. Міне, сондықтан да ИФТ пайдалану кезеңінде бруцеллезге оң нәтиже көрсеткен мал саны күрт өсе түсті, алайда эпизоотиялық жағдай жақсара қоймады. Мысалы, ИФТ бойынша бруцеллезбен ауру сиыр малының саны 2009 жылы 2007 жылмен салыстырғанда (ИФТ қолданғанға дейінгі уақыт) Ақмола, Ақтөбе, Атырау, ШҚО, Қостанай, Павлодар және СҚО облыстарында тиісінше 5,2; 7,1; 9,3; 8,2; 8,9; 5,0 және 7,4 есе өсіп кетті [4]. Бұл деректер Қазақстанда сезімталдығы жоғары ИФТ-ында антиген ретінде бруцелланың ЛПС-ін қолдану грам теріс бактерияларға антиденелері бар сиыр малының біршама бөлігін бруцеллез ауруына жалған оң нәтиже көрсетуіне әкелгендігін дәлелдейді. Бұл сыналымды енгізудің алғашқы жылдарындағы жалған оң реакциялардың себебі тек грам теріс бактериялардың арасындағы айқыш-реакция ғана емес, сонымен поствакциналық антиденелер де болуы мүмкін. Индеттік жағдай қиындай бергеннен кейін 2013 жылы бруцеллезді серологиялық диагностикалау үшін классикалық реакцияларды (РБС, АР және КБР) қайта пайдалану және мал басын вакцинациялауға оралу туралы шешім қабылданды. ИФТ сезімталдығы жоғары сыналым ретінде сау шаруашылық субъектілерінің 4-6 айлық төлдерін серологиялық зерттеу ғана үшін ұсынылған (ҚР Үкіметінің 2013 жылғы 8 қарашадағы қаулысымен бекітілген Ветеринарлық (ветеринарлық-санитариялық) ережелердің 1063-тармағы). Кейіннен АШМ-нің 2019 жылғы 23 мамырдағы "Ветеринарлық (ветеринарлық-санитариялық) ережелерді бекіту туралы" (бұдан әрі "Ережелер...") №206 бұйрығына сәйкес ҚР АШМ 2015 жылғы 29 маусымдағы № 7-1/587 бұйрығына өзгерістер мен толықтырулар енгізілді. Жаңа "Ережелерде..." (1081-тармақ) ИФТ, РДСК-мен қатар, *Brucella ovīs* тудыратын ауруға күдік туындаған кезде ғана қой малын зерттеуге арналған.

Бруцеллез бойынша қолайлы пункттерде, эпизоотологиялық бірліктерде жүргізілетін ветеринариялық іс-шаралардың жаңа ережесіне сәйкес (2-

параграф) бруцеллезге диагноз қою үшін мал басына (иттер мен мысықтардан басқаларына) бастапқы диагностикалық зерттеулер жүргізген кезде бір сынама үлгісі бойынша екі кезеңде жүргізіледі.

Бірінші кезеңде диагностикалық зерттеулер РБС және КБР қолданумен жүргізіледі. Бұл кезеңде КБР малдың барлық түрлері үшін қан сарысуының 1:5 сұйылтынымен қойылады. Егер диагностикалық зерттеудің бірінші кезеңінің қорытындысы бойынша РБС және КБР нәтижелері теріс болса, онда мал сау деп танылады да, бастапқы диагностикалық зерттеулердің екінші кезеңі жүргізілмейді. Диагностикалық зерттеулердің екі әдісі (РБС және КБР) бойынша нәтижелер теріс болған жағдайда сараптама актісі (сынақ хаттамасы) рәсімделінеді.

Диагностикалық зерттеулердің екінші кезеңінде АР қойылады. Аталмыш сыналымда сиырдың, жылқының және түйенің 1:50, 1:100, 1:200, 1:400; қойдың, ешкінің, маралдың және буйволдың 1:25, 1:50, 1:100, 1:200; терісі бағалы аңдардың 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 қан сарысуларының сұйылтынымдары қолданылады, ал КБР малдың барлық түрлері үшін қан сарысуларының 1:5 және 1:10 сұйылтынымдарымен қойылады.

Диагностикалық зерттеудің екінші кезеңі мына келесі жағдайларда міндетті түрде жүргізіледі: егер алғашқы диагностикалық зерттеулердің бірінші кезеңінің нәтижелері:

- диагностикалық зерттеу әдістерінің бірі (РБС немесе КБР) бойынша оң немесе күмәнді болып келсе;

- диагностикалық зерттеулердің екі әдісі бойынша да күмәнді немесе оң нәтиже алынса (РБС және КБР).

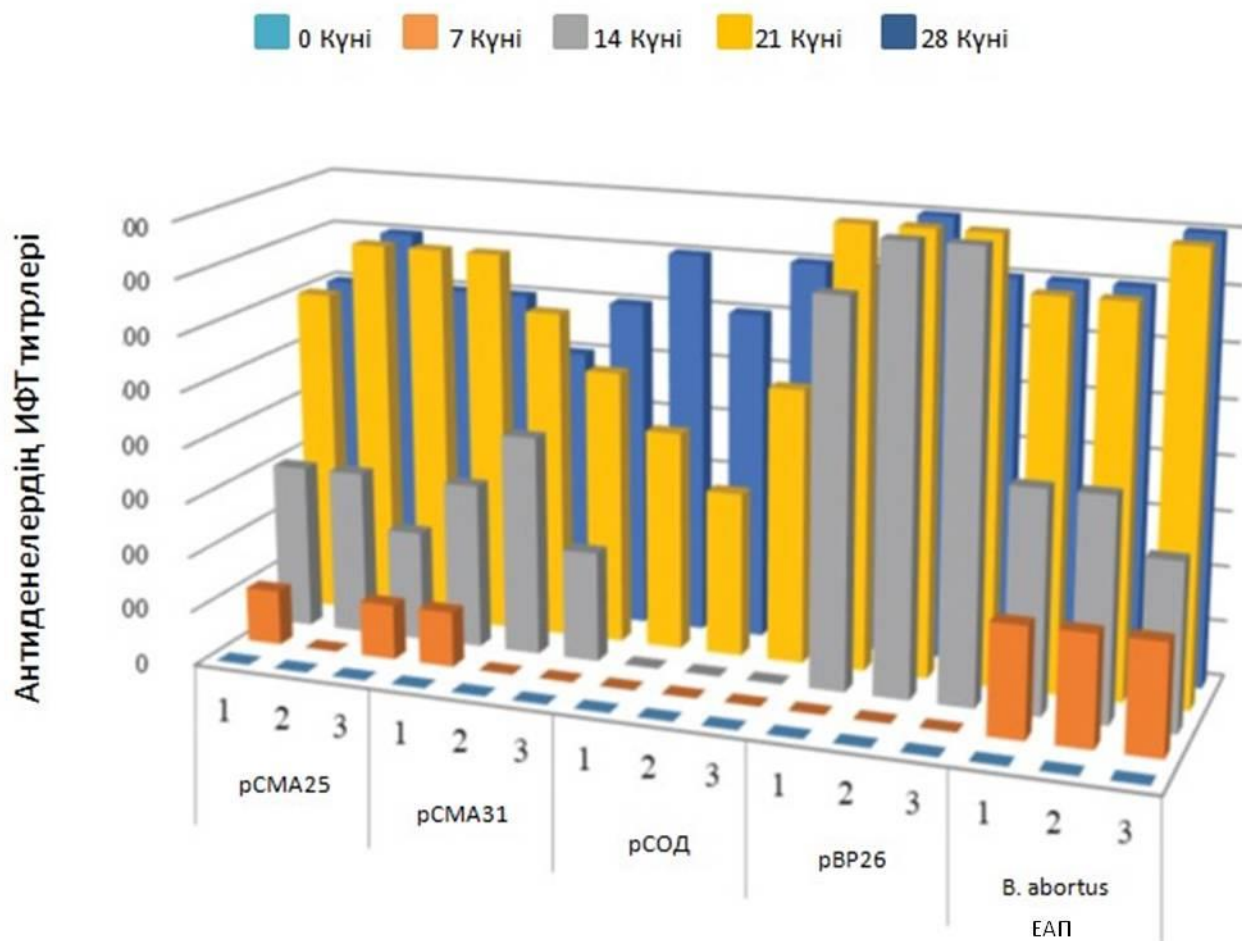
Мал басын бруцеллезге зерттеудің бірінші кезеңінде екі серологиялық реакцияны, әсіресе КБР-сын, қолдану диагностикалық жұмысты біршама қиындатады. Біріншіден, РБС және КБР-ында біріңғай бруцеллез антигенінің қолданылуы бұл сыналымдардың телімділігін айтарлықтай төмендетеді. Өйткені, бұл препараттың негізгі антигені – грам теріс бактериялар арасында өзара ұқсас эпитоптары бар ЛПС-тер. Екіншіден, РБС "прозон" феноменіне немесе қан үлгілерінде бұғаттаушы және агглютинацияға қабілетін жоғалтқан антиденелердің болуына байланысты жалған теріс нәтижелер беруі мүмкін, үшіншіден, РБС және КБР-ын қолдану оңай жұмыс емес [203, 204] және бұл сыналымдар бруцеллезге мал басына жаппай скрининг жасауға бейімделмеген.

Қорыта айтқанда, бруцеллезді жоюға қарсы атқарылып жатқан ауқымды іс-шаралардың кешеніне қарамастан әлемнің көптеген елдерінде, соның ішінде ҚР-да, эпизоотиялық және эпидемиялық жағдай өте күрделі қалпында қалып отыр. Индетке қарсы күрестің тиімділігін арттыруда ең басты іс-шараның бірі - ауру жұқтырған мал басын дер кезінде анықтай алатын және жануарларды қысқа мерзімде жаппай тексеруге ыңғайлы, автоматтандырылған және сезімталдығы мен телімділігі жоғары сыналымдарды қолдану. Мұндай сыналымдарды бруцеллез қоздырғышына тән болып саналатын СМА-дарын

сезімталдықтары жоғары ИФТ-дың немес ИХТ-дың және басқа да заманауи иммунологиялық әдістерді қолдана отыра дайындауға болады.

2.2.2. *Brucella*-ның жалқы рекомбинантты сыртқы мембрана ақуыздарының салыстырмалы сипаттамасы

Бруцелланың ақуыздық препараттарының ақ тышқандар үшін иммуногенділігін ж-ИФТ көмегімен зерттеу нәтижелері 5-ші суретте көрсетілген.



5-ші сурет – Бруцелланың табиғи және рекомбинантты ақуыздарының иммуногенділігі.

1, 2, 3 – тышқандардың нөмірі

5-ші суреттен көрсетілгендей, зерттеулерімізде қолданылған *Brucella*-ның ақуыздық препараттардың иммуногенділігі әртүрлі деңгейде болды. Мысалы, pCu-ZnCOD және pBP26-мен имунделген тышқандардың қан сарысуларын 7 тәуліктен кейін зерттегенде бұл үлгілерден телімді антиденелерді таба алмадық. Алайда, бұл мерзімде *B. abortus*-тың ЕАП-ы мен, pCMA25 және pCMA31 ақуыздармен имунделген тышқандарда имундық жауап антидене түзілу түрінде байқала бастады. pCu-ZnCOD-қақарсы антиденелер имундеудің 14-ші күнінде де анықталмады, ал pCMA25-пен және pCMA31-мен егілген жануарлардың аталмыш екі ақуызға телімді антиденелерінің титрі 1:200-ден

1:800-ге дейінгі аралықта болды. Назар аударатын мәселе -рBP26-мен иммунделген жануарлардың титрлерінің (1:6400-1:12800) айтарлықтай жоғары болуы. рBP26-ның келесі инъекциялары сарысу антиденелері концентрациясының жоғарылауына әкелмеді. Үшінші иммунизациядан кейін рСМА25 пен рСМА31-ге және *B. abortus*-тың ЕАП-на қарсы антиденелердің түзілуі тиісінше 1:3200-1:6400 және 1:6400-1:12800 дейін көтеріліп, өздерінің шырқау шегіне жетті (21 күн). Алайда, рCu-ZnСОД-қа қарсы антиденелер осы деңгейге тек иммундеудің 28-ші күні ғана жетті. Иммунизацияның соңына қарай (42-ші күн) гомологиялық ақуыздарға қарсы гипериммунды сарысулардың титрі 1:12800 көтерілді.

Гетерогендік ақуыздарға қарсы антисарысулардың айқас реактивтілігін зерттеу нәтижелері 1-ші кестеде берілген.

1-ші кесте ж-ИФТ көмегімен бруцелланың ақуыздарына тышқандардың гипериммунды сарысуларының айқас реактивтілігі

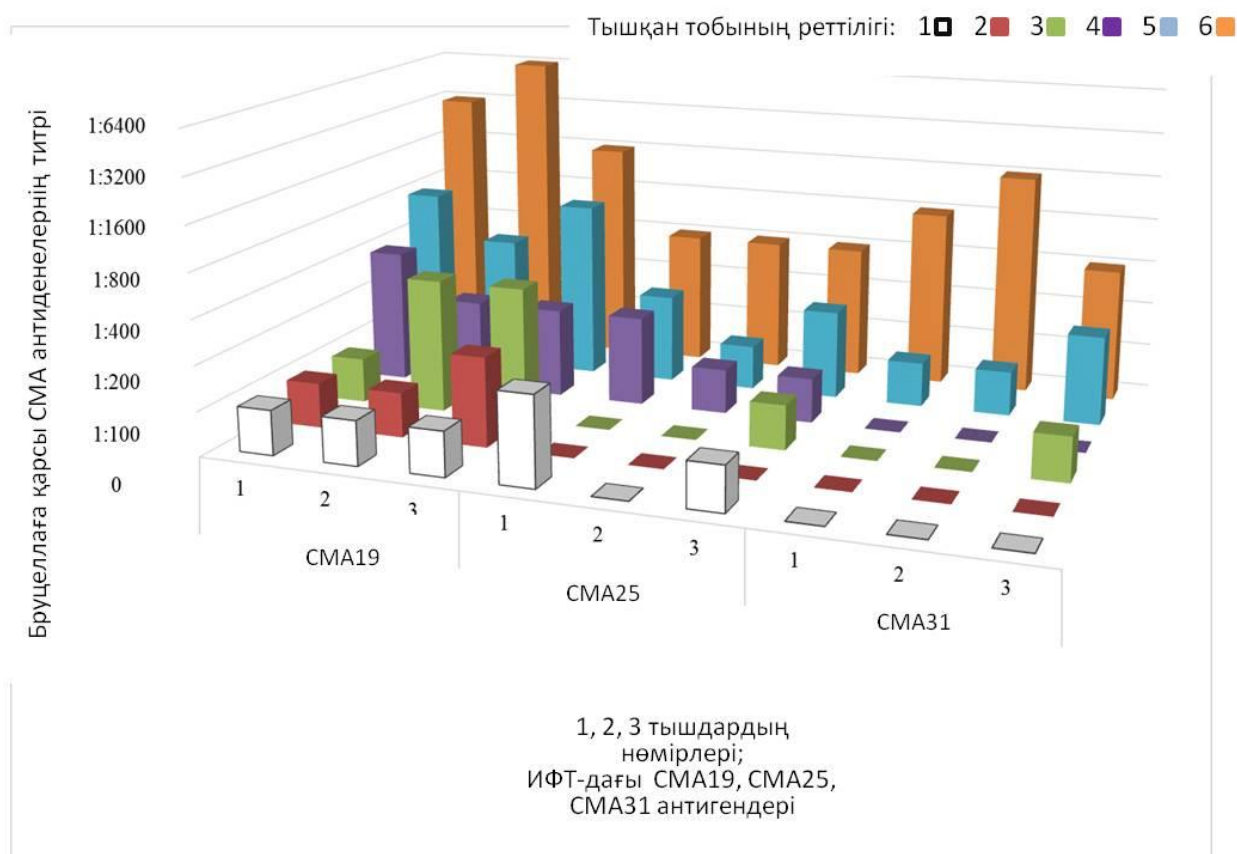
<i>Brucella</i> ақуыздарына қарсы антисарысулардың титрлері					
<i>Brucella</i> ақуыздары	ЕАП	рСМА31	рCu-ZnСОД	рBP26	рСМА25
ЕАП	1:12,800	1:400	ТН *	ТН	1:200
рСМА31	1:800	1:12,800	ТН	1:1600	1:400
рCu-ZnСОД	ТН	ТН	1:12,800	ТН	ТН
рBP26	1:400	1:400	ТН	1:12,800	1:200
рСМА25	1:3200	1:1600	ТН	1:400	1:12,800
* ТН: теріс нәтиже					

1 кестенің деректеріне сүйенсек, бруцелланың ЕАП-нетән антиденелер рСМА25, рСМА31 және рBP26 ақуыздарына тиісінше 1:3200, 1:800 және 1:400 титрлерінде байланысқа түскен, алайда олар рCu-ZnСОД-ты ж-ИФТ-ында танып алмады. Бұл антигенмен қолданылған гетерогендік антисарысулардың бірде-біреуі әрекеттесе алмады. Күтілгендей, рCu-ZnСОД антисарысуы да табиғи және рекомбинантты ақуыздардың ешқайсысымен байланыса алмады. рСМА25, рСМА31 және рBP26 араларында әртүрлі қарқындылықтағы айқаспалы реакциялар байқалды.

B. abortus 19 штаммының инактивацияланған тұтас жасушаларымен иммунизацияланған қояннан 56-шы күні алынған гипериммунды сарысу *B. abortus*-тың ЕАП-мен 1:51200 сұйылтымына дейін әрекеттесе алды. Бұл қан сарысуы рекомбинантты бруцелла ақуыздарының антигенділігін ж-ИФТ-ында анықтау үшін қолданылды. Иммунологиялық талдау нәтижелері гипериммунды сарысу антиденелері рСМА31 мен рBP26 және рСМА25 пен рCu-ZnСОД ақуыздарымен тиісінше 1:3200 және 1:12800 сұйылтынымдарына дейін жоғары аффинділікпен байланыса алатындығын көрсетті. Өз кезегінде бұл нәтижелер

рекомбинантты антигендердің *E. coli* BL21 штаммымен белсенді түрінде экспрессияланатындығын дәлелдейді.

Келесі зерттеулерімізде *Brucella*-ның pCMA19-дың ақ тышқандарға ж-ИФТ-ындағы иммуногенділігі қоздырғыштың pCMA25 және pCMA31 ақуыздарымен салыстыра отыра анықталды. Зерттеу нәтижелері 6-шы суретте көрсетілген.



6-шы сурет–*Brucella*-ның pCMA19, pCMA25 және pCMA31 ақуыздарының салыстырмалы иммуногенділігі.

6-шы суретте бейнеленген диаграммалар II топтың тышқандары pCMA19-ға қарсы антиденелерді бір ғана тері асты инъекциясынан кейін және адьюванттың көмегісіз-ақ түзей алды. III, IV және V топтардың тышқандарда антиденелерді өндіру үшін қолданылған иммунизация кестесі антиденелердің қарқынды түрде түзілуіне әкелді. ТФА немесе ТеФА-ында эмульсияланған pCMA19-бен егілген тышқандардың көпшілігінің сарысу үлгілерінің ең төменгі сұйылтуларындағы антиденелер pCMA25 және pCMA31-мен айқыш-реакцияға түсті. Көңіл аударатын мәселе – тек қана ТФА-мен (I топ) егілген тышқандардың сарысулары ж-ИФТ-ында pCMA19 және pCMA25-пен 1:100 немесе 1:200 сұйылтымдарында оң нәтиже көрсетті. pCMA19-ға антиденелердің ең жоғарғы титрлері (1:1600-1:6400) Фрейнд адьюванттарымен 3 рет егілген VI топ тышқандарының сарысу үлгілерінде анықталды. Дегенмен, алынған антисарысу pCMA25 және pCMA31-ге біршама айқыш реактивтілік көрсетті.

рСМА19 антигенділігі:

- *B. abortus* 19 штаммының инактивирленген тұтас жасушалармен иммунизацияланған қояндардың қан сарысулары;
- *B. abortus* 544 штаммымен тәжірибелі түрде жұқтырылған ірі қара малдың сарысуларын;
- бруцеллезге қарсы ревакцинацияланған сиырлардың қан сарысулары;
- жаңа індет ошағының вакцинация алмаған және РБС немесе КБР бойынша бруцеллезге оң нәтиже көрсеткен сиырларының қан сарысулары;
- бруцеллезден таза ферманың екпе алмаған серонегативті сиырларының қан сарысуларын (v) қолдану арқылы зерттелді.

2 кестеде көрсетілгендей, рСМА19 қоян антисарысуында басқа ақуыздарға қарағанда төменірек антигенділік қасиет көрсетті.

2-ші кесте - рСМА–дарының *B. abortus* 19-дың тұтас жасушаларына қарсы қоян сарысуындағы антигенділігі

Қояндардың жеке нөмірлері	Иммунизациядан кейінгі күндер	ИФТ-ында рСМА-ға қарсы антиденелер титрі		
		рСМА 19	рСМА 25	рСМА 31
1	14	1: 400	1:1600	1:800
2		1:800	1:1600	1:1600
1	21	1:1 600	1:3 200	1:3 200
2		1:1 600	1:3 200	1:3 200
1	35	1:3200	1:6 400	1:3 200
2		1:3200	1:6 400	1:3 200
1	45	1:6400	1:6 400	1:6 400
2		1:3 200	1:6 400	1:6 400
Антиденелердің орташа титрлері		1:980	1:1970	1:1490
		(77,8%; - 43,8%)	(65,9%; - 39,7%)	(70,5%; - 41,3%)

B. abortus 19-дың тұтас жасушаларымен егілгеннен кейінгі 14-ші, 21-ші, 35-ші және 45-ші күндері рСМА19 антисарысуларының орташа титрлері рСМА25 және рСМА31 ақуыздарына қарсы антиденелердің титрлеріне қарағанда айтарлықтай төмен болды ($p < 0,05$). Дегенмен бұл деректер, рСМА19 –дың рСМА25 және рСМА31 сияқты *B. abortus* 19 инактивтелген тұтас жасушаларына қарсы қоян қан сарысуымен танылатынын дәлелдеп, *E. coli* BL21 штаммымен белсенді түрде экспрессияланатындығын меңзейді.

3 кестенің нәтижелері *B. abortus* 544 штаммымен тәжірибелі түрде жұқтырылған ірі қара мал басының сарысуларында қолданылған 3 рСМА-ның салыстырмалы антигенділігі көрсетілген.

3-ші кесте –рСМА-дардың бруцеллезбен жұқтырылған ірі қара малдың қан сарысуларында антигенділігі

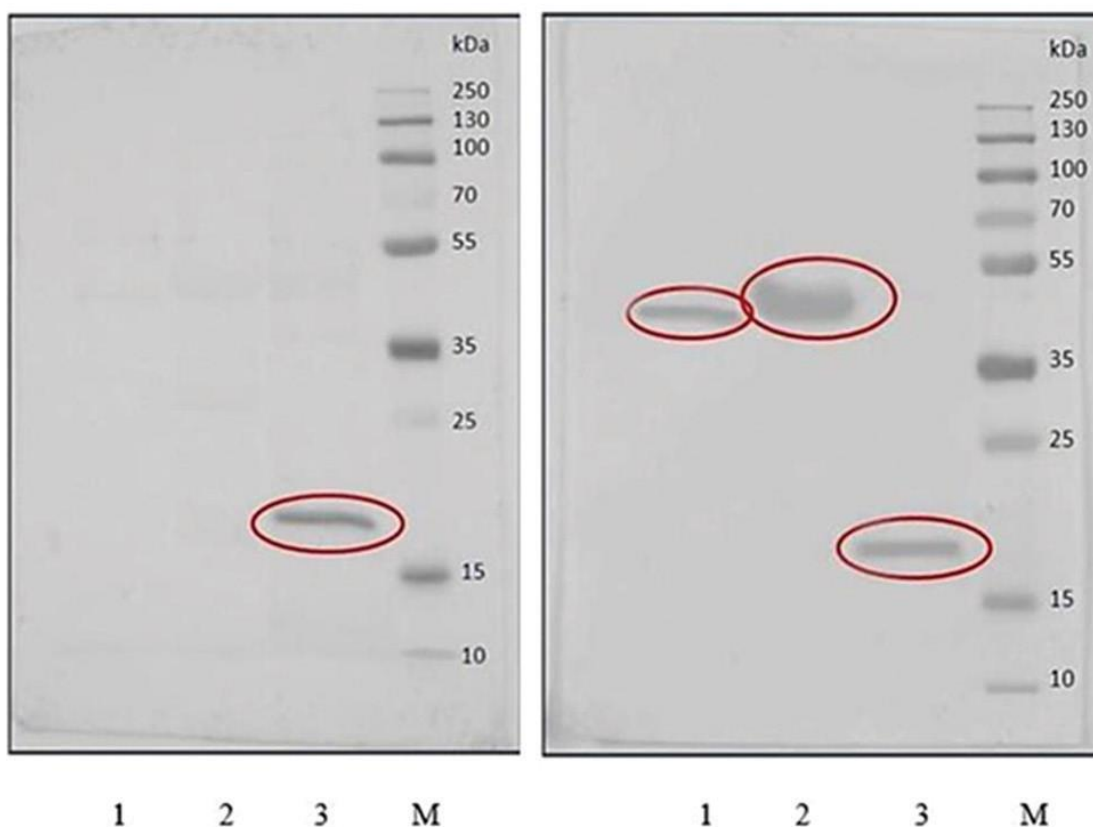
Сиырлардың нөмірі	ИФТ-ында антиген ретінде қолданылатын рекомбинантты ақуыздар					
	рСМА19		рСМА25		рСМА31	
	<i>B. abortus</i> 544-пен жұқтырылғаннан кейінгі күндер					
	14	28	14	28	14	28
	ОТз және ОТб қатынасы					
6	3,6	11,5	5,5	14,2	1,7*	5,8
7	2,6	11,2	0,6*	3,5	1,0*	2,2
8	3,0	12,1	1,7*	8,1	0,8*	1,3*
9	2,9	10,9	2,3	9,6	1,8*	2,2
10	11,0	9,1	4,1	7,1	0,5*	2,4
16	5,4	12,0	2,7	9,0	3,6	2,5
17	4,6	11,8	1,5*	9,1	3,9	3,6
18	19,0	13,2	6,8	11,7	6,6	5,9
19	14,5	12,7	2,1	2,5	4,3	3,5
20	6,5	12,4	3,3	14,7	0,7*	0,8*
27	4,2	10,9	1,2*	8,4	1,6*	1,8*
30	5,5	11,6	3,2	8,1	4,0	2,2
ОТз/ОТб	6,9±3,0	11,6±1,1	2,9±1,8	8,8±3,6	2,5±1,9	2,9±1,6
орташа мәні						

*- теріс нәтижелер

3-ші кестенің мәліметтерінен ИФТ-ында бруцеллезбен ауру сиыр малының антиденелерін анықтауда рСМА19 ақуызы басқа рекомбинантты антигендер мен салыстырғанда анағұрлым жоғары сезімтал екендігін көруге болады. Мысалы, СМА19-ға қарсы антиденелер иммунизацияның 14-ші күні барлық жұқтырылған жануарлардың сарысу үлгілерінде анықталса, рСМА31 және рСМА25-терге тән антиденелер тәжірибедегі мал басының тиісінше 42% және 67%-ында ғана болды. Ал, рСМА31-гетелімді антиденелер иммунизацияның 14-ші және 28-ші күндерінде де 3 сиырда (N8, 20 и 27) табылмады. Одан қалды, ОТз/ОТб мәндері бойынша бұл кезеңде рСМА31 қарсы антидене өнімі деңгейінің айтарлықтай өзгеруі байқалмады, керісінше рСМА19 және рСМА25-ке телімді гуморалдық жауап біршама айқын байқалды: тиісінше 6,9±3,0-11,6±1,1 ($p<0,05$) және 2,9±1,8-8,8±3,6 ($p<0,01$).

Жұқтырылғаннан кейін 14-ші күні қолданылған ақуыздарға тән антидене титрлері бір-бірінен айтарлықтай ерекшеленбейтін деңгейде болып, мына келесі көрсеткіштермен сипатталы: рСМА19 - 1:650 (+36,6%, -27,3%), рСМА25 - 1:400 (+36,6%, -27,3%) және СМА31 - 1: 420 (+ 18,9%, -15,9%). Дегенмен, жұқтырылғаннан кейін 28-ші күні рСМА19-ға бағытталған антиденелер титрі (1:6400) рСМА25 және рСМА31-мен салыстырғанда айтарлықтай жоғары болды (тиісінше 1:2600 және 1:2200; $p < 0,05$).

7-ші суретте иммуноблотингтің нәтижелері көрсетілген.



7-сурет - *Brucella abortus*-қа қарсы сиырдың (сол жақта) және қоянның (оң жақта) сарысуларымен қойылған рСМА-ының вестерн блоты.

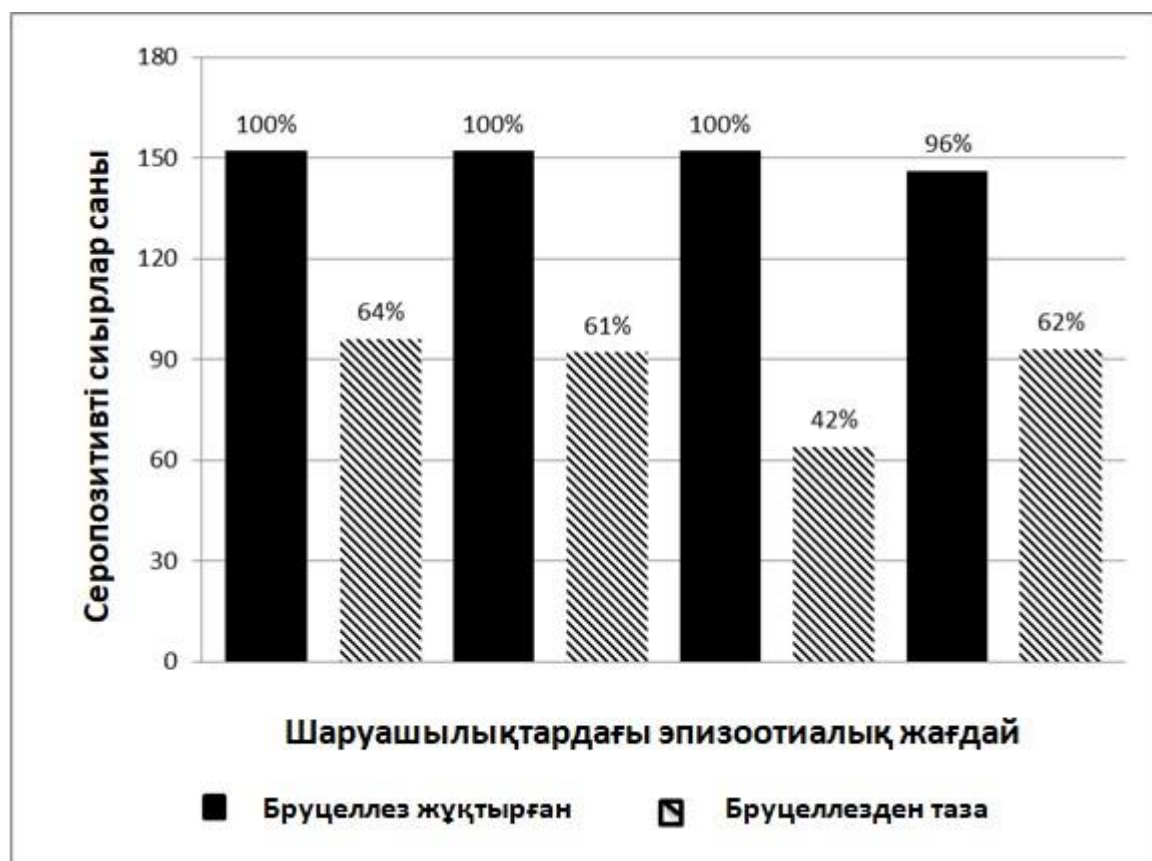
1 - рСМА25; 2 - рСМА31; 3 - рСМА19; М- молекулярлық маркерлер

7 суретте назар аударсақ, *B. abortus* 544-пен жұқтырылған N6 сиырдан 28-ші күні алынған сарысу үлгілері иммуноблот әдісінде рСМА19 ақуызының жолағымен ғана әрекеттесе алды, ал қызығы - *B. abortus* 19-дың залалсыздандырылған тұтас жасушаларымен егілген қояндардың антиденелері мол. с. 42, 48 және 19 кДа болатын тиісінше рСМА25, рСМА31 және рСМА19 ақуыздарының жолақтарын тани алды. Бұл өлшемдер құрамында тироксині бар СМА25 және рСМА31 ақуыздарының мол.с. сәйкес келеді.

Бруцеллезден таза ($n=151$) және індет таралған фермалардың сиырларынан ($n=152$) алынған қан сарысуларының үлгілерін қолдана отыра рСМА-дарының антигенділігін анықтау нәтижелері 4-ші кесте мен 8-ші суретте берілген.

4-ші кесте – *Brucella*-ның рСМА-дарының антигенділігін зерттеу нәтижелері

Серологиялық сыналымдар (n=152)				Серологиялық сыналымдар (n=151)			
РБС	Рекомбинантты ақуыздарға бағытталған ИФТ			РБС	Рекомбинантты ақуыздарға бағытталған ИФТ		
	рСМА19	рСМА25	рСМА31		рСМА19	рСМА25	рСМА31
Оң нәтиже көрсеткен жануарлардың саны, мал басы (%)				Оң нәтиже көрсеткен жануарлардың саны, мал басы (%)			
152	152	152	146	96	92	64	39
Антиденелер титрі				Антиденелер титрі			
1:280 (+2,1; -2,1)		1:370 (+2,1; -2,1)	1:350 (+2,8; -2,7)	1:280 (+4,2; -4,0)		1:250 (+5,0; -4,8)	1:210 (+3,5; -3,3)



8 - сурет - *Brucella*-ның рСМА-дарының антигенділігін зерттеу нәтижелері

(мына суретте 1-бағанның астына РБС, 2-шісіне - рСМА19 3-шісіне - рСМА25, 4-шісіне - рСМА31 деп жазу керек)

B. abortus 19 штаммынан жасалған екпемен ревакцинацияланған сиырлардың сарысу үлгілерінде РБС бойынша телімді антиденелер 10 айдан кейін зерттелген малдың жартысынан көбінде (61-64%) табылды және ИФТ/рСМА31 және ИФТ/рСМА19 сынамаларында антиденелердің орташа

титрлері тиісінше 1:210 (+3,5; -3,3%) және 1:280 (+4,2%; -4,0%) деңгейінде болды. Осы шарттарда рСМА25 антигенділігі төмен болды. Бруцеллалардың рСМА25 ақуызына тән антиденелер 1:250 (+5,0%; -4,8%) орташа титрімен ірі қара малдың 42%-ында анықталды.

Айта кететін жағдай, сиырлардың үштен бірінің (28%) сарысу үлгілерінде қолданылған рСМА-ға қарсы антиденелер болмады. Үш ақуыздың біреуіне немесе бір мезгілде екеуіне антиденелер сиырлардың тиісінше 13% және 28%-ында анықталды. Жоғарғы корреляция коэффициентімен сипатталатын тікелей қатаң сәйкестік (0,70; $p < 0,01$) ж-ИФТ/рСМА19 және ж-ИФТ/рСМА31 сынамаларының нәтижелерінің арасындағы байқалды. Орташа корреляция ж-ИФТ/рСМА19 және ж-ИФТ/рСМА25 аралықтарында ($r=0,38$; $p < 0,05$), сонымен қатар ж-ИФТ/рСМА31 және ж-ИФТ/рСМА25 аралықтарында ($r=0,35$; $p < 0,05$) байқалды.

Бруцеллез жұқтырған шаруашылықтардың барлық серопозитивті сиырларында ($n=152$) агглютинирулеуші антиденелер РБС-ында анықтады. Бұл сыналымдардың барлығында рСМА19 және рСМА25 ақуыздарына негізделген антиденелердің бар екендігі ИФТ-ында тиісінше 1:280 және 1:370 (+2,1%; -2,1%) орташа титрлерімен расталды. Серопозитивті жануарлардың тек 4%-ында ғана РБС бойынша рСМА31-ге қарсы телімді антиденелер болмады. Аталмыш ақуызға қарсы антиденелердің орташа титрі 1:350 (+2,8%; -2,7%) тең болды. Бруцеллезге қатысты әртүрлі статустағы фермалардан алынған сиырлардың рСМА19-ға қарсы антиденелерінің орташа титрлерін салыстырғанда айтарлықтай айырмашылықтар болмады. Алайда, жаңа індет ошақтарындағы ірі қара малдың сарысу үлгілерінде рСМА25 және/немесе рСМА31-ге қарсы бағытталған антиденелердің титрлері вакцинамен қайтара егілген сау сиырлардың титрлерімен салыстырғанда айтарлықтай жоғары болды ($p < 0,05$).

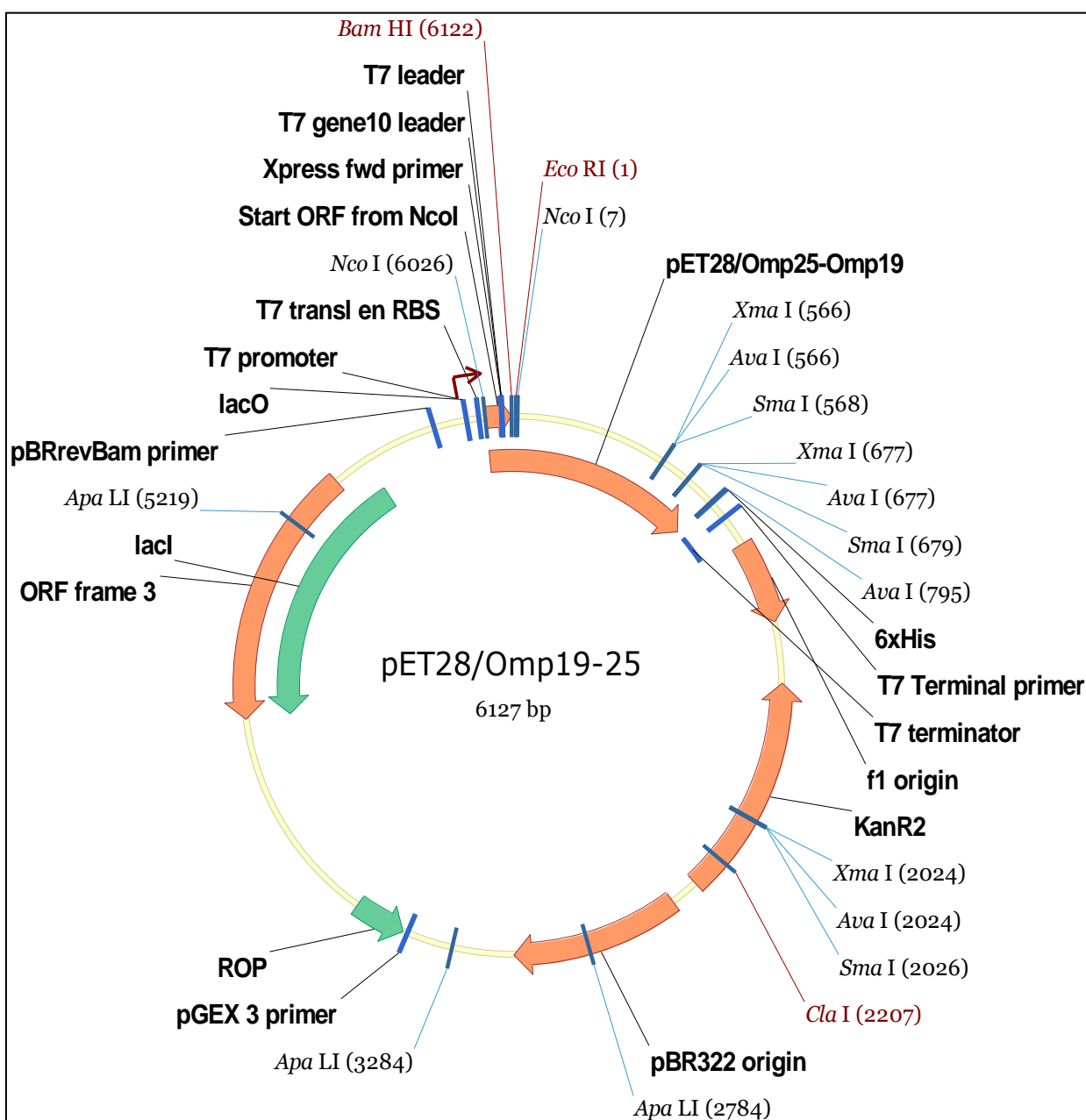
Қорыта келе, біздің нәтижелеріміз *Brucella* тұқымының минорлы рСМА19 ақуызы оның мажорлы рСМА25 және рСМА31-мен біртұтас антиген ретінде бруцеллезге қарсы алғашқы рет екпе жасау алдында ауру жұқтырған мал басын дәлірек анықтай алатын ИФТ-ын әзірлеуде пайдаланылу мүмкіншілігін көрсетеді. Алайда антиген ретінде ауру қоздырғышының бірнеше ақуыздарын қолдану, біріншіден, серологиялық сыналымның өзіндік құнының өсуіне әкеледі; екіншіден, мұндай құрама антигеннің құрамына енетін жалқы ақуыздың әлсіз антигендік және/немесе басқа грам теріс микроорганизмдермен айқыш-реакцияға түсетін эпитоптарының да болуы әбден мүмкін; үшіншіден, тұтас молекулалы ақуыздарды ИФТ-да қолданылатын полистиролға немесе нитроцеллюлозаға отырғызу олардың арасында бәсекелестік те туындайды. Демек, бруцеллездің серологиялық балауына жарамды антигенді дайындау үшін ауру қоздырғышының екі немесе одан да көп СМА-ның иммунодоминантты аймақтарын таңдап алып, олардан бір құрама ақуыз құрастыру керек.

2.2.3 Бруцеллалардың рекомбинантты мультипротеиндерін алу және олардың серологиялық әлеуетін бағалау

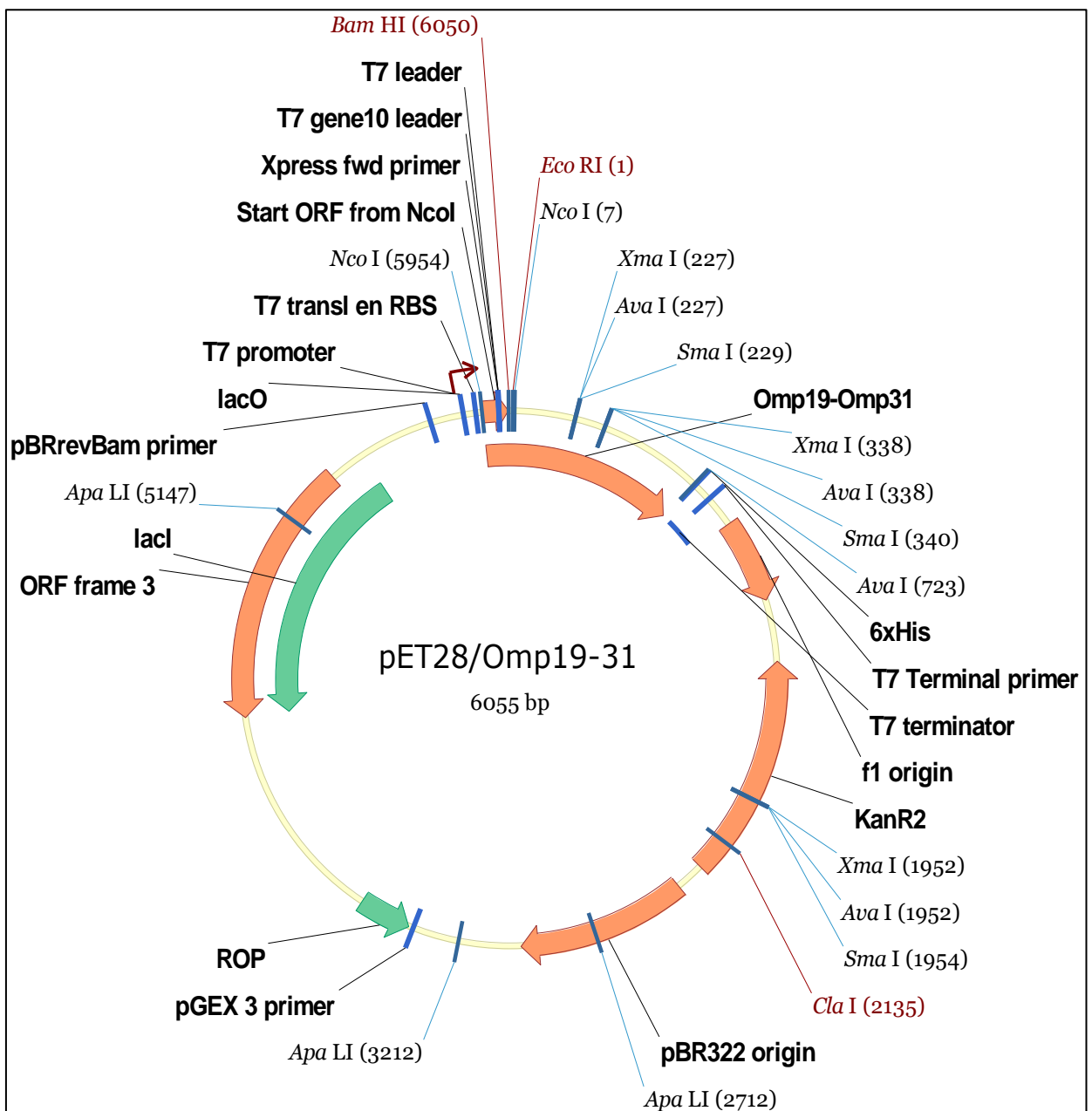
2.2.3.1 СМА25+19, СМА19+31 және СМА25+31 ақуыздарының синтезіне жауапты гендердің генетикалық конструкцияларын құрастыру.

Гендердің нуклеотидтік тізбектерінің негізінде рСМА25+19, рСМА19+31 және рСМА25+31 комбинациялары дайындалынып, бруцелланың аталмыш мультиэпитопты ақуыздарының синтезіне жауапты 3 химерлік генетикалық конструкция жасалынды.

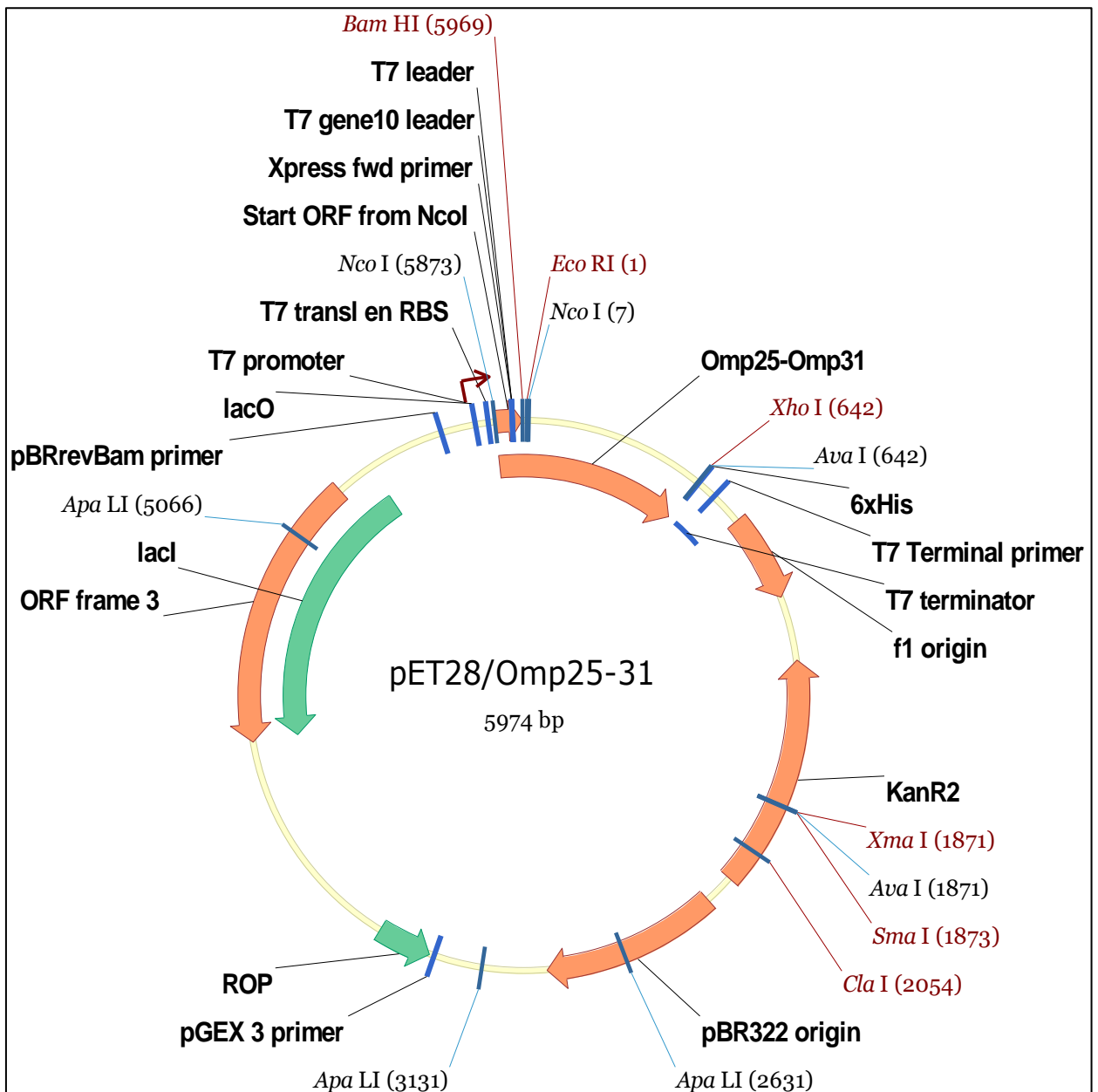
Генетикалық конструкциялардың сұлбасы 9-шы, 10-шы және 11-ші суреттерде көрсетілген.



9-шы сурет – *Brucella*-ның рСМА19+25-тің жұптастырылған генетикалық құрылымы



10-шы сурет – *Brucella*-ның pCMA19+31-дің жұптастырылған генетикалық құрылымы



11-ші сурет – *Brucella*-ның pCMA25+31-дің жұптастырылған генетикалық құрылымы.

pCMA25+31, pBVM19+25 және pBVM19+31 ДНҚ тізбектері Macrogen (Сеул, Оңтүстік Корея) компаниясының синтезделді. Синтезделген өнім тиісінше 4 мкг ДНҚ концентрациясы бар лиофилденген түрде алынды (12-сурет).



1 – pCMA25+31; 2 – pBVM19+25; 3 – pBVM19+31 ДНҚ генін кодтайтын синтезделген тізбектер

12-ші сурет Macrogen (Сеул, Оңтүстік Корея) компаниясының ДНҚ сынамалары

Өндірушінің ұсынысына сәйкес алынған ДНҚ үлгілері 50 мкл mQ суда ерітіп. Сұйылтылған үлгілерді -20°C температурада сақтап қойдық.

Brucella-ның жұптастырылған pCMA-ының генетикалық құрылымындағы гендердің нуклеотидтік тізбектері 5 кестеде келтірілген.

5-ші кесте – *Brucella*-ның pCMA25+19, pCMA19+31 және pCMA25+31 ақуыз гендерінің нуклеотидтік тізбегі

Мульти-протеиндер	Нуклеотидтік тізбектер
	<u>BamH1 EcoR1 NcoI</u>

5-ші кестенің жалғасы

<p>pCMA25+1 9</p>	<p>cGGATCCGAATTCCCATGGcatgggcgaaaaaaagcaaatggcctggaag tgaaacagggctttgaaggcagcctgcgcgcgcgcgtgggctatgatctgaacccggtgatgc cgtatctgaccgcgggcattgcgggcagccagattaaactgaacaacggcctggatgatgaaa gcaaatttcgctgggctggaccgcgggcgcgggcctggaagcgaaactgaccgataacattc tgggccgcgtggaatcgcgtatacccagatggcaacaaaaactatgatctggcgggcaccac cgtgcgcaacaaactggatacccaggatttcgcgtgggcattggctataaattctggcgggct gccagagcagccgcctgggcaacctggataacgtgagcccgccgccgccggcgccggt gaacgcggtgccggcgggcaccgtgcagaaaggcaacctggatagcccgaccagttccga acgcgccgagcaccgatatgagcgcgcagagcggcaccaggtggcgagcctgccgccgg cgagcgcgccggtatgacccgggcgcggtggcgggcgtgtggaacgcgagcctgggcg gccagagctgcaaaattgcaccccgagaccaaataatggccagggtatcgcgcgggccccg ctgcgctgccgggcgaactggcgaacctggcgagctgggcggtgaacggcaaacagctgg tgctgatgatgcg _____6His-tag_____ Xho1</p> <p>aacggcggcaccgtggcgagcctgtatagccatcatcatcatcattaaCTCGAGcc</p>
<p>pCMA19+3 1</p>	<p><u>BamH1 EcoR1 Nco1</u></p> <p>cGGATCCGAATTCCCATGGcactggcgggctgccagagcagccgcctgggc aacctggataacgtgagcccgccgccgccggcgccggtgaacgcggtgccggcgggc accgtgcagaaaggcaacctggatagcccgaccagttccgaacgcgccgagcaccgatat gagcgcgcagagcggcaccaggtggcgagcctgccgccggcgagcgcgccggtatgac cccgggcgcggtggcgggcgtgtggaacgcgagcctgggcggccagagctgcaaaattgcg accccgagaccaaataatggccagggtatcgcgcgggcccgtgcgctgccgggcgaact ggcgaacctggcgagctgggcggtgaacggcaaacagctggtgctgatgatgcgaacggcg gcaccgtggcgagcctgtatagcaaacggaaacaaagtggaatggtttggcaccgtgcgcg cgcgctgggctataccgcgaccgaacgacctgatggtgatggcaccggcggcctggcgatg gcaaatgaaaagcgcgttaacctggcgatgatgcgagcgcgctgcatacctggagcgata aaacaaagcgggctggaccctgggcgcgggcgcggaatatgcgattaacaacaac _____6His-tag_____ Xho1</p> <p>atggaccctgaaagcgaatatctgtataccgatctgggcaaacgcacatcatcatcatcatta aCTCGAG</p>
<p>pCMA25+3 1</p>	<p><u>BamH1 EcoR1 Nco1</u></p> <p>cGGATCCGAATTCCCATGGcatgggcgaaaaaaagcaaatggcctggaag tgaaacagggctttgaaggcagcctgcgcgcgcgcgtgggctatgatctgaacccggtgatgc</p>

5-ші кестенің жалғасы

	<p>cgtatctgaccgcgggcattgcgggcagccaagattaactgaacaacggcctggatgatgaaa gcaaatttcgcgtgggctggaccgcgggcgcgggcctggaagcgaactgaccgataacattc tgggccgcgtggaatcgcataaccagatggcaacaaaaactatgatctggcgggcaccac cgtgcgcaacaaactggatacccaggatttcgcgtgggcattggctataaattaaagcggaaa ccaaagtggaatggttggcaccgtgcgcgcgcgcctgggctataaccgcgaccgaacgcctga tgggtgatggcaccggcggcctggcgtatggcaaagtgaaaagcgcgttaacctgggcgatg atgcgagcgcgctgcatacctggagcgataaaaccaaagcgggctggaccctgggcgcggg cgcggaatatcgattaacaacaactggaccctgaaaagcgaatatctgtatac</p> <p style="text-align: center;"><u>6His-tag</u></p> <p style="text-align: right;"><u>Xho1</u></p> <p>cgatctgggcaaacgccatcatcatcatcattaaCTCGAGcc</p>
--	---

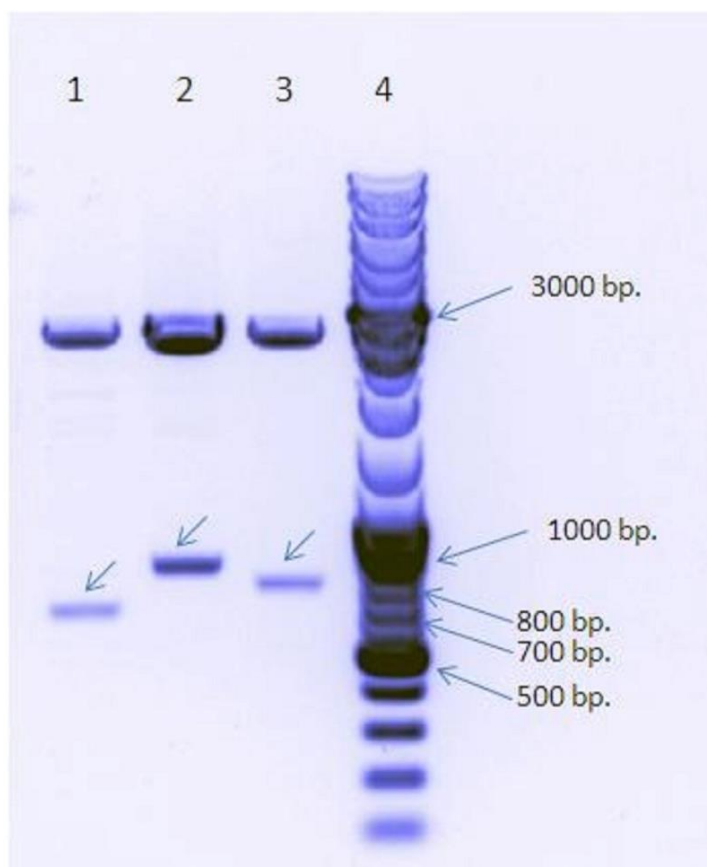
Бұл тізбекте BamHI/EcoR1 және NcoI (бас әріптермен белгіленген) және bhis-Tag (курсивпен белгіленген) шектеу сайттары бар.

6-шы кестеде CMA19, CMA25 және CMA31 ақуыздарының иммунодоминантты бөлімдерінде орналасқан аминқышқылдарының тізбегі көрсетілген.

6-шы кесте – *Brucella*-ның мультипротеиндерін құрастыруға таңдап алынған CMA-дарының аминқышқылдар тізбегі

<i>Brucella</i> -ның CMA-дары	<i>Brucella</i> -ның CMA-дарының аминқышқылдар тізбегі
CMA31	KAETKVEWFGTVRARLGYTATERLMVYGTGGLAYGKVKS AFNLGDDASALHTWSDKTKAGWTLGAGAEYAINNNWTLK SEYLYTDLGKR
CMA25	WAKKSKDGLEVKQGFEGSLRARVGYDLNPVMPYLTAGIA GSQIKLNGLDDESKFRVGTAGAGLEAKLTDNILGRVEY RYTQYGNKNYDLAGTTVRNKLDTQDFRVGIGYKF
CMA19	LAGCQSSRLGNLDNVSPPPPAPVNAVPAAGTVQKGNLDSPT QFPNAPSTDMSAQSGTQVASLPPASAPDLTPGAVAGVWNA SLGGQSKIA TPQTKYGGYRAGPLRCPGELANLASWAVN GKQLVLYDANGGTVASLYS

Дайындалған мультипротеиндік ақуыздардың гендерінің репликациядан кейінгі және қолданылған вектор фрагменттерінің электрофореограммасы 13-суретте берілген.

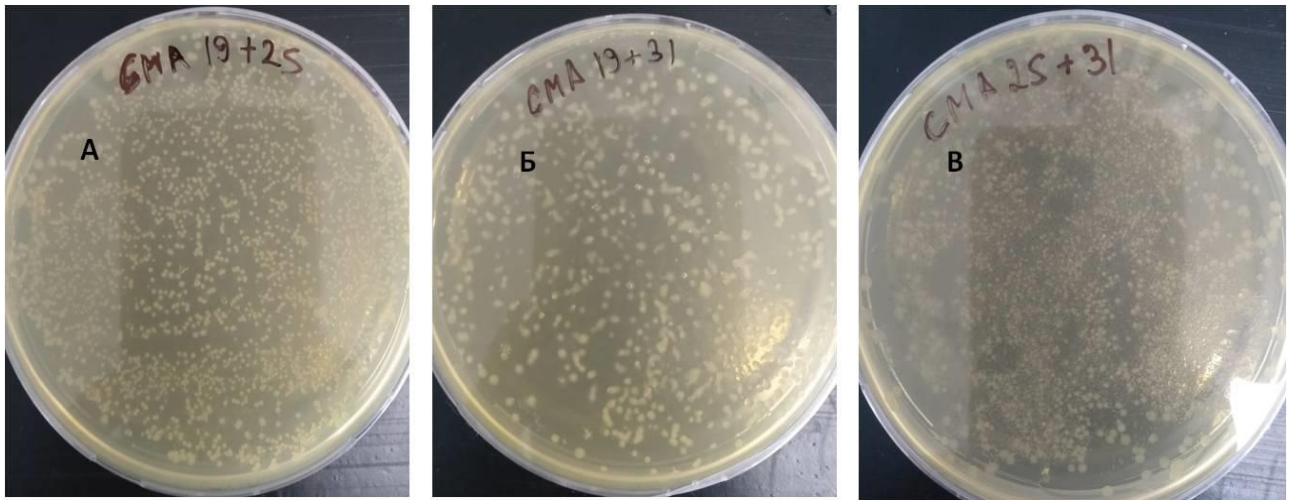


13-ші сурет –Бруцелланың химерлік СМА гендерінің рестрикциясының және рUC57 векторының фрагменттері.
 (1) рСМА25+31 (653 ж.н.); (2) рСМА19+25 (806 ж.н.); (3) рСМА19+31 (734 ж.н.); (4) маркерлер.

Қорыта айтқанда, осы жұмыстың нәтижесінде біз қажетті иммуногендік ақуыздарды кодтайтын гендер тізбегін, молекулярлық-генетикалық жұмысқа және плазмидтік векторларға тізбектерді енгізуге қажетті рестрикция сайттарын, сондай-ақ жалпы бактериялық массадан рекомбинантты ақуыздарды тазартуға керегі 6His-Tag заттың басы бар үш генетикалық конструкциясын жасадық.

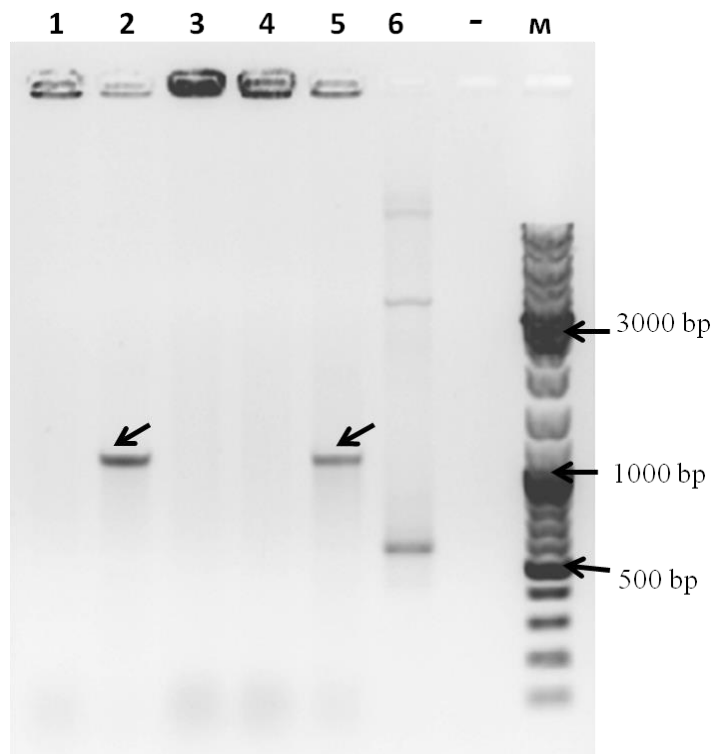
2.2.3.2 СМА25+19, СМА19+31 және СМА25+31 гендерін экспрессиялық векторға клондау

Әрі қарайғы жұмыс үшін жеткілікті препараттық мөлшерді алу үшін рСМА25+31; 2 – рБВМ19+25; 3 – рБВМ19+31 ДНҚ гендерінің тізбегі бар плазмидалар *E. coli* штаммының DH5 α компитентті жасушаларына трансформацияланды (14-сурет).



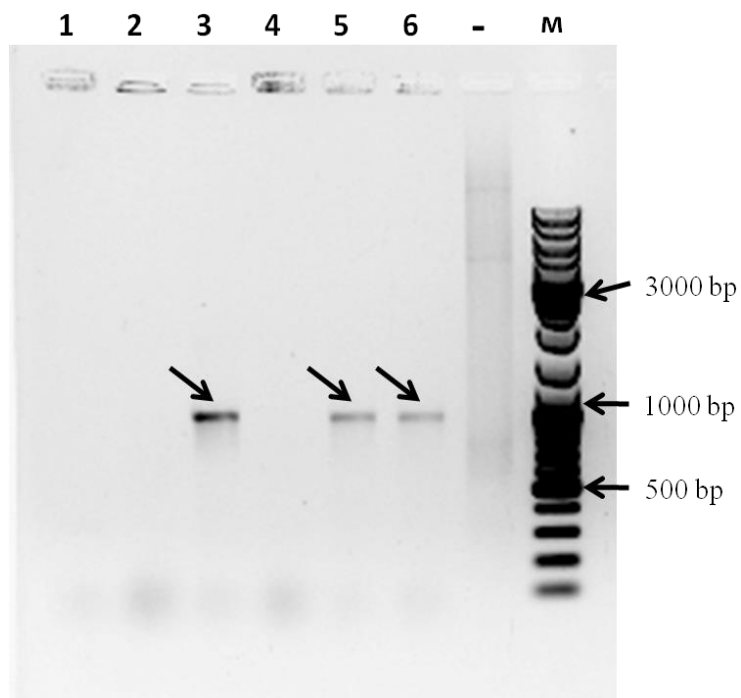
14-ші суретте *E. Coli*-дің DH5 α штамына жасушаларды трансформациялау нәтижесінің көрінісі.

Трансформацияланған гендердің болуын растау үшін әрбір Петри табақшасынан өсірілген колонияларға ПТР скринингі жүргізілді. CMA19+25, CMA19+31 және CMA25+31 конструкциялары үшін M13 forward және M13 revers коммерциялық праймерлер қолданылды, өйткені синтезделген гендер енгізілген плазмида M13 бактериофагының негізінде түзілген (15,16,17 - суреттер).



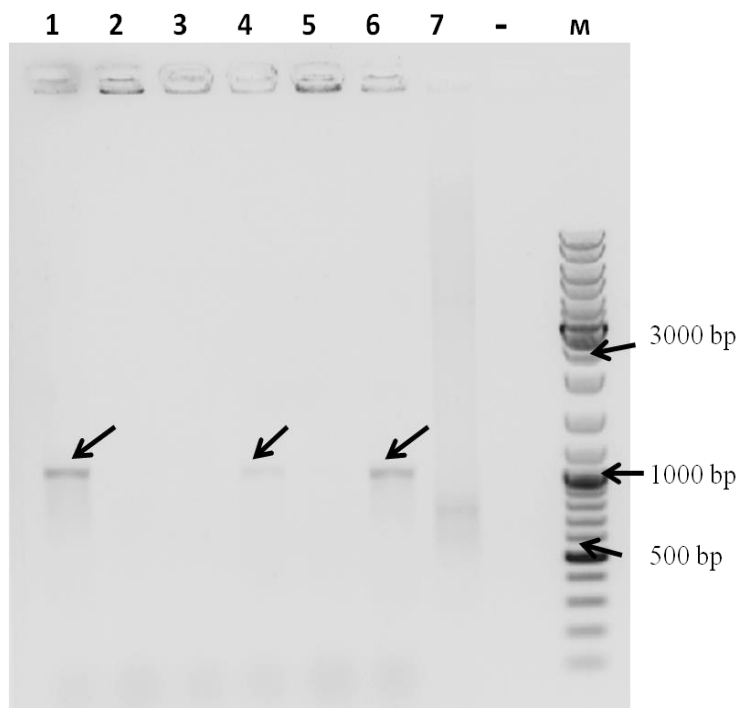
15-ші суретте CMA19+25 ПТР өнімдерінің электрофореграммасы

2-5 – колониялар оң нәтиже көрсетті; 7 – теріс бақылау; М – ДНҚ маркер



16-ші суретте SMA25-31 ПТР өнімдерінің электрофореграммасы

3, 5, 6 – колониялар оң нәтиже көрсетті; 7 – теріс бақылау; М – ДНҚ маркер



17-ші суретте SMA19-31 ПТР өнімдерінің электрофореграммасы

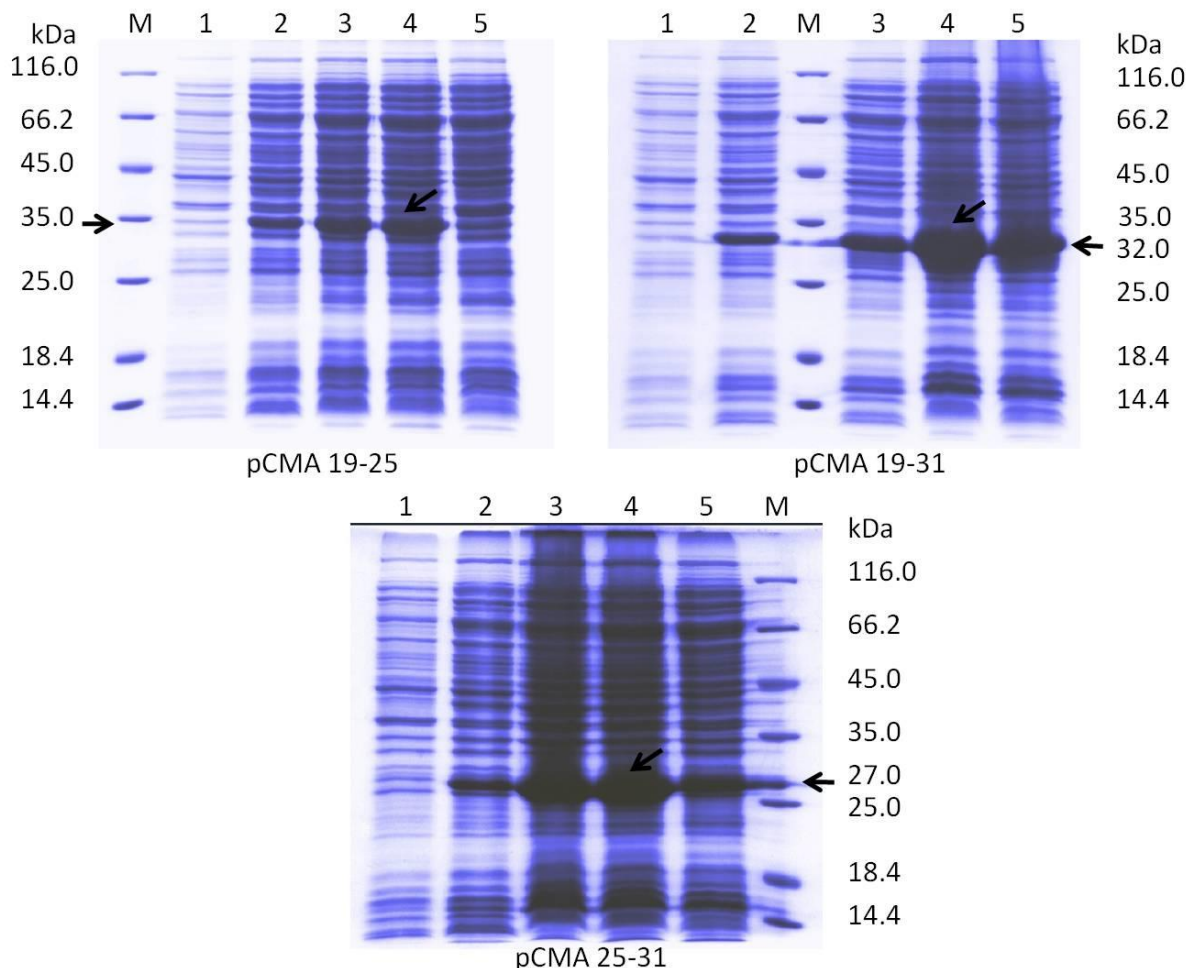
1, 4, 6 – колониялар оң нәтиже көрсетті; 7 – теріс бақылау; М – ДНҚ маркер

15, 16, 17 суреттерде көрсетілгендей, трансформация сәтті өтуіне байланысты, ПТР-ге алынған сынамалар әр Петри табақшаларынан 2-3-ден оң нәтижелі клондар көрсетті. СМА19+25, СМА19+31 және СМА25+31 үш гибридті ақуызды кодтайтын ДНҚ кірістірмесінің рестрикциясы және оны электрофоретикалық талдау күтіліп отырған көлемдегі, яғни 806, 734 және 653 ж.н. ДНҚ жолақтарын анықтады.

Бөлініп алынған ДНҚ фрагменттер гелден тазартылып, экспрессиялық векторлармен лигирленіп (жалғанып), *E. Coli* BL21 (DE3) жасушаларына трансформацияланды. Бактерия жасушалары ЛБ сұйық қоректік ортасында өсірілді және ақуыздардың экспрессиясын күшейту мақсатында қоректік ортаға ИПТГ қосылды.

2.2.3.3 СМА25+19, СМА19+31 және СМА25+31 гендердың өндіруші штамдағы индукциясын анықтау

Жасуша лизаттарының ДСН-ПААГ-інде өткізілген электрофорезінің нәтижелері 18-ші суретте көрсетілген.



18-ші сурет –*Brucella*-ның pCMA-дарының ДСН-ПААГ-інде алынған электрофореграммасы

1 – ИПТГ индукциясына дейін; 2 – ИПТГ индукциясының 2 сағатынан кейін; 3 – ИПТГ индукциясының 4 сағатынан кейін; 4 – ИПТГ

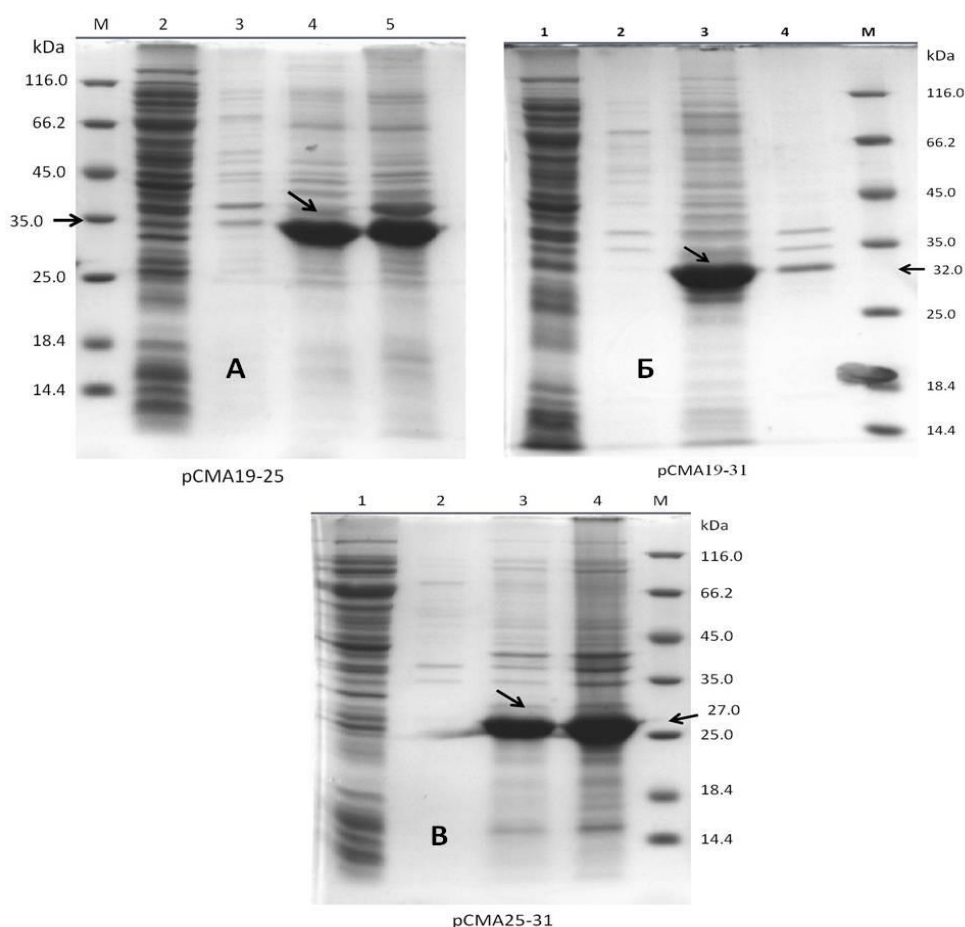
индукциясының 6 сағатынан кейін; 5 – ИПТГ индукциясының келесі күні; 6 – Маркерлер.

18-ші суреттен *E. Coli* BL21 (DE3) жасушалары мақсатты ақуыздарды (pCMA19-25, pCMA19-31 және CMA25-31) ЛБ сұйық қоректік ортасына ИПТГ қосқаннан кейін 6-сағат өткен соң жоғары мөлшерде өндіре бастағанын байқауға болады.

2.2.3.4 CMA25+19, CMA19+31 және CMA25+31 гендерін экспрессиялық векторға клондау

Рекомбинантты ақуыздарды тазарту және хроматографиярCMA-ын сұйықтық тұнбасынан бөліп алу үшін құрамында несепнәрі бар ерітінді қолданылды. Алынған фракциялардың электрофорез нәтижелері 16-суретте көрсетілген.

19-суреттен көрініп тұрғандай, рекомбинантты ақуыздардың ең көп мөлшері тұнба құрамында 8M несепнәр бар ерітіндімен өндегеннен кейін үстіңгі сұйық қабатта байқалды. Кейін алынған фракцияларды өндірушінің нұсқауларына сәйкес HisTrap түтікшесі қолдану арқылы, метал афинді хроматография әдісімен әрі қарай тазаладық.



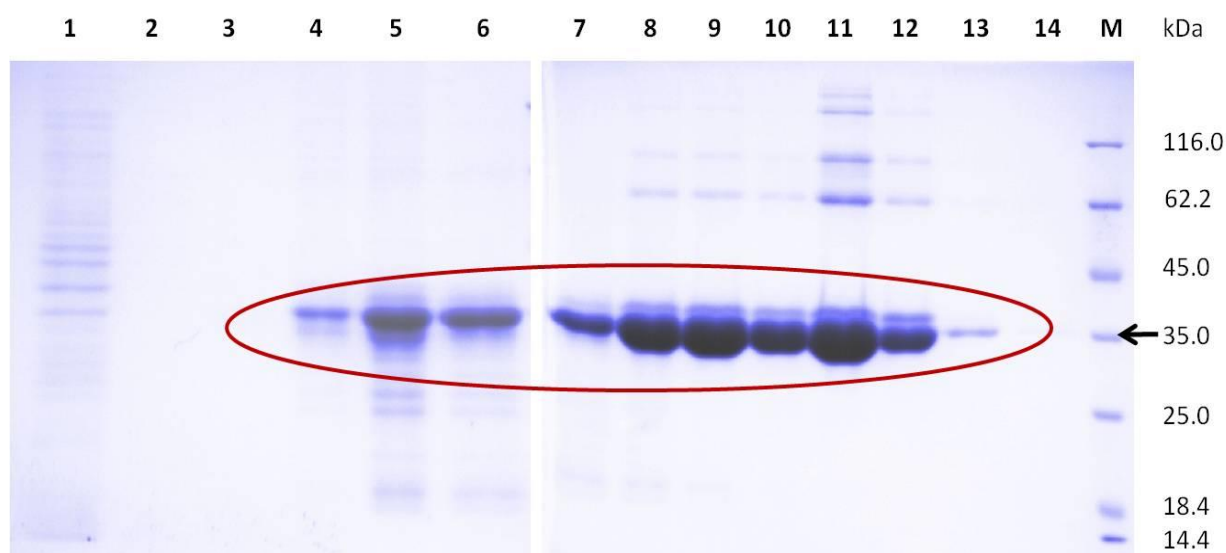
19-ші сурет –*Brucella*-ның мультипротеиндерін тазартудан кейінгі ДСН-ПААГ-інде алынған электрофореграммасы

А) 1 – ақуыздық маркер; 2 – ультрадыбыспен езілген түнгі культура; 3 – 1М несепнәрлі ерітіндімен өңделген сұйықтық; 4 – 8М несепнәрлі ерітіндімен өңделген сұйықтық; 5 – 1млТНЕ ертіндісімен өңделген тұнба

Б) 1 – ультрадыбыспен езілген түнгі культура; 2 – 1М несепнәрлі ерітіндімен өңделген сұйықтық; 3 – 8М несепнәрлі ерітіндімен өңделген сұйықтық; 4 – 1млТНЕ ертіндісімен өңделген тұнба; 5 – ақуыздық маркер

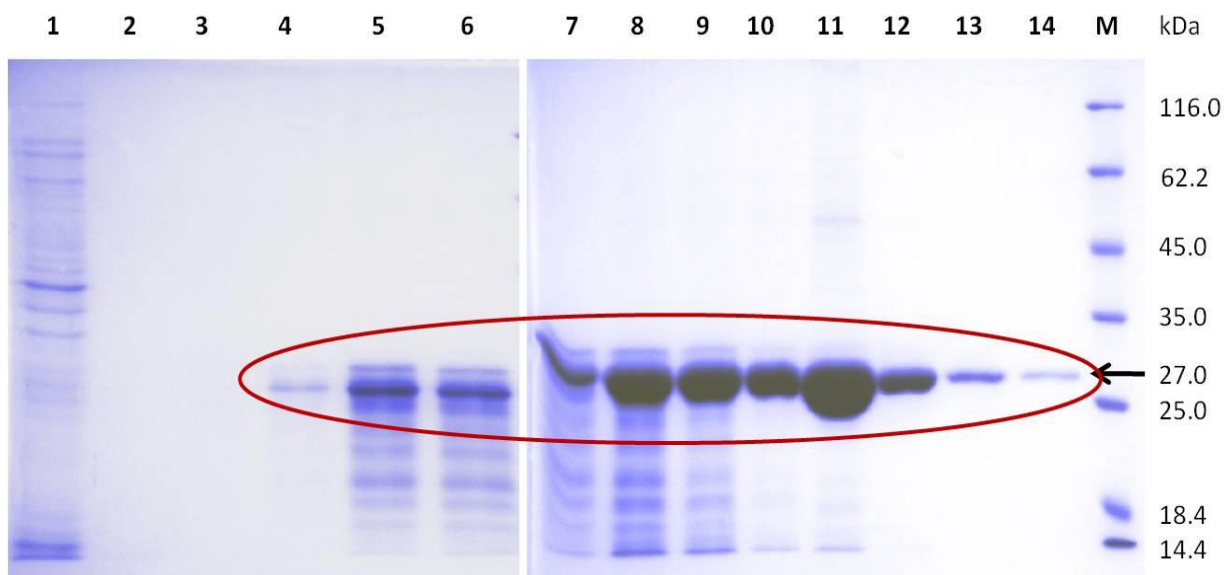
В) 1 – ультрадыбыспен езілген түнгі культура; 2 – 1М несепнәрлі ерітіндімен өңделген сұйықтық; 3 – 8М несепнәрлі ерітіндімен өңделген сұйықтық; 4 – 1млТНЕ ертіндісімен өңделген тұнба; 5 – ақуыздық маркер

Металл хелат хроматографиясы (Ni^{2+}) арқылы тазартылған *Brucella*-ның химерлік рСМА-дарының электрофоретогаммасы 20-шы, 21-шы және 22-ші суреттерде көрсетілген.



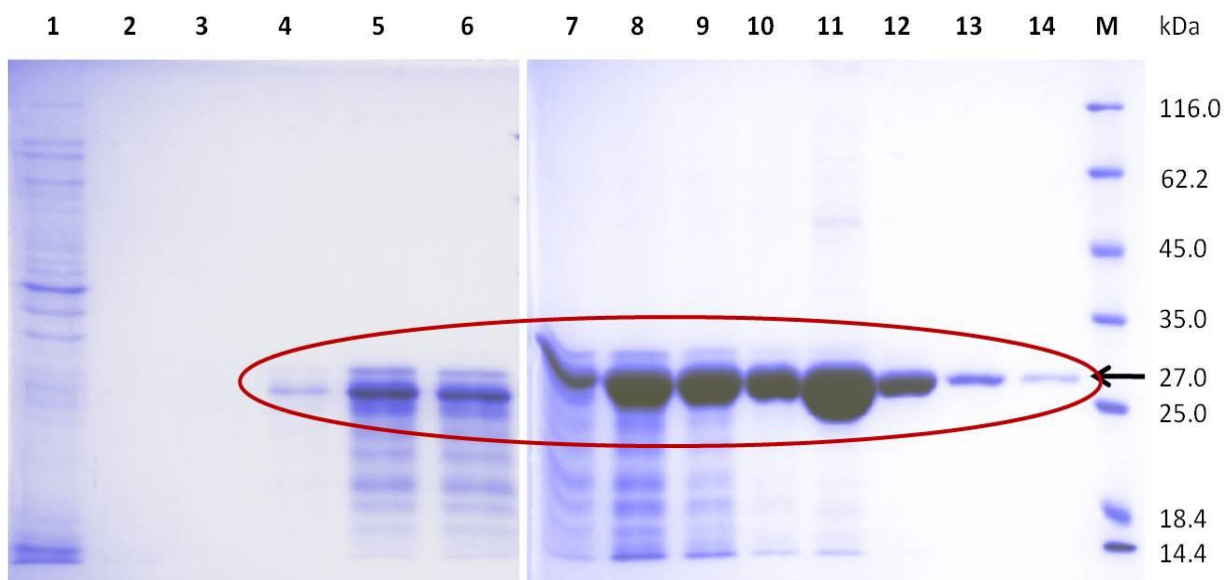
20-ші сурет – хроматографиялық тазартудан кейінгі рСМА19-25 фракциялық электрофорез көрінісі.

1 – Хроматографиядан кейінгі сынама; 2 – 20 мМ имидазол ертіндісімен шаю; 3 – 50 мМ имидазол ертіндісімен; 4, 5, 6 – 50 мМ имидазол ертіндісімен; 7, 8, 9, 10 – 150 мМ имидазол ертіндісімен; 11, 12, 13, 14 – фракция 500 мМ имидазол; 15 – ақуыздық маркер



21-ші сурет – хроматографиялық тазартудан кейінгі рСМА25-31 фракциялық электрофорез көрінісі.

1 – Хроматографиядан кейінгі сынама; 2 – 20 мМ имидазол ертіндісімен шаю; 3 – 50 мМ имидазол ертіндісімен; 4, 5, 6 – 50 мМ имидазол ертіндісімен; 7, 8, 9, 10 – 150 мМ имидазол ертіндісімен; 11, 12, 13, 14 – фракция 500 мМ имидазол; 15 – ақуыздық маркер

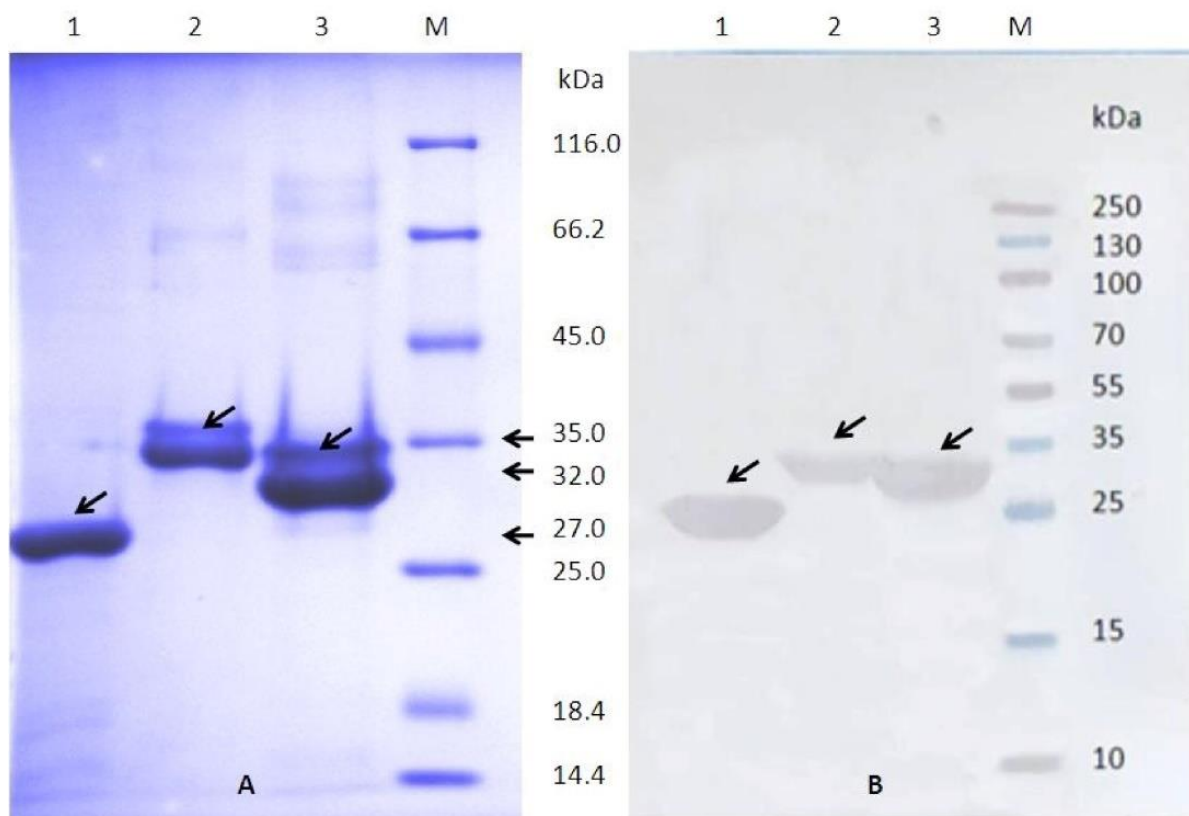


22-ші сурет – Хроматографиялық тазартудан кейінгі рСМА19-31 фракциялық электрофорез көрінісі.

1 – Хроматографиядан кейінгі сынама; 2 – 20 мМ имидазол ертіндісімен шаю; 3 – 50 мМ имидазол ертіндісімен; 4, 5, 6 – 50 мМ имидазол ертіндісімен; 7, 8, 9, 10 – 150 мМ имидазол ертіндісімен; 11, 12, 13, 14 – фракция 500 мМ имидазол; 15 – ақуыздық маркер

20, 21, 22 - суреттерден көрініп тұрғандай, ақуызды элюция 50 мМ имидазолы бар буферді қосудан басталады, алайда, қоспасыз таза ақуыздың шығуы 150 мМ және 500 мМ имидазолды қолданылған фракцияларда байқалады.

Өндіріген рСМА-дың ДСН-ПААГ-індегі электрофорезі және экспрессияланған ақуыздардың вестерн-блоттингтегі антигенділігі (23-ші суретте келтірілген).



1

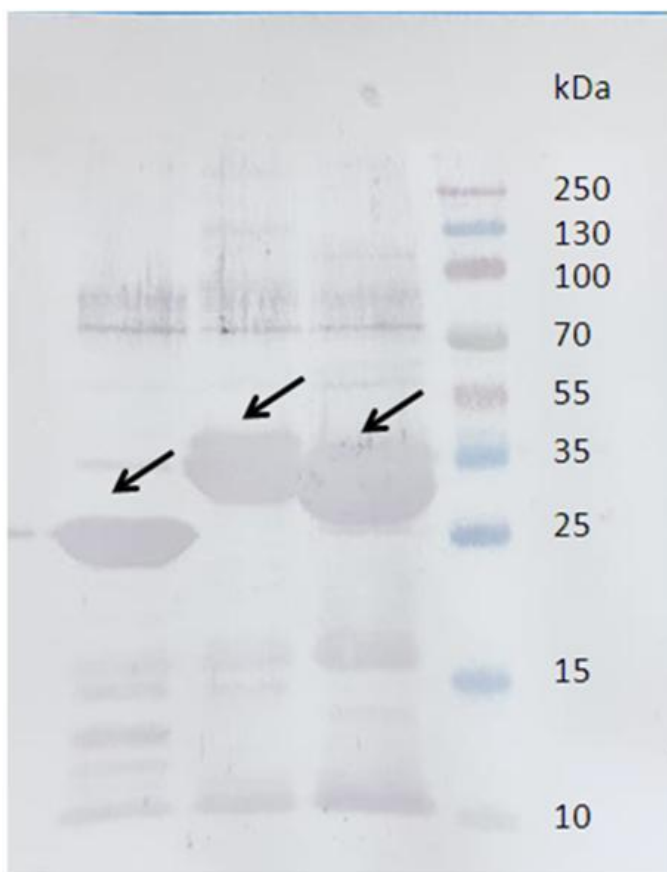
23-ші сурет – 1-ші жолақ - рСМА25+31; 2-ші жолақ - рСМА19+25; 3-ші жолақ - рСМА19+31; М - маркерлер.

Escherichia coli BL21 (DE3) экспрессиялаған рСМА-дың ДСН-ПААГ-індегі электрофорезі (А) және экспрессияланған ақуыздардың вестерн-блоттингтегі антигенділігі (В). *Brucella*-ның рекомбинантты ақуыздары 12% ДСН-ПААГ электрофорезі көмегімен бөлініп алынды және R250 бромфенол көк түске боялды(А). Ақуыздардың антигенділігі ж-ИФТ-ында *Brucella abortus* 19 штаммының залалсыздандырылған тұтас жасушаларға қарсы титрі 1:51200 болатын қоянның антисарысуын қолдану арқылы анықталды (В).

23-ші сурет мақсатты өнімдердің электрофорез нәтижелері бойынша мол. с. 35, 32 және 27кДа болатын тиісіншер СМА19+25, рСМА9+31 және рСМА25+31 ақуыз жолақтарына бөлінгендігін көрсетеді.

Осы суреттен көрініп тұрғандай, *B. abortus* 19 штаммының фенолмен залалсыздандырылған тұтас жасушалары мен қоянды иммундеудің 45-ші күні алынған гипериммунды қан сарысуы рекомбинантты ақуыздардың *Brucella* тұқымына телімділігін иммуноблоттинг әдісінде растай алды.

Алынған ақуыздардың *Brucella* тұқымдасына жататын бактерияларға тән антигенділігі дәстүрлі реакциялар бойынша (АР және КБР) бруцеллезге оң нәтиже берген сиырдың қан сарысуын қолдану арқылы иммуноблот тәсілінде дәлелденді (сурет 24).



24-ші сурет - АР және КБР бойынша бруцеллезге оң нәтиже берген сиырдың қан сарысуымен мультипротеиндерді иммуноблот көмегімен анықтау
1-ші жолақ: pCMA25/31; 2-ші жолақ: pCMA25/19; 3-ші жолақ: pCMA19/31; М: маркерлер

Иммуноблот нәтижелері дәстүрлі реакциялар бойынша ауруға шалдыққан деп танылған сиырдың қан сарысуындағы антиденелер зерттеуге алынған 3 рекомбинантты ақуыздардың жолақтарымен әрекеттесіп, олардың *Brucella*-ға тән екендігін дәлелдеп отыр.

Бруцеллалардың химерлік және/немесе жалқы ақуыздарының салыстырмалы антигенділігін қоянның *B. abortus* 19 штаммының залалсыздандырылған тұтас жасушаларына қарсы гипериммунды сарысуын қолдана отыра зерттегенде 7-ші кестеде көрсетілген нәтижелер алынды.

7-ші кесте – Бруцелла рСМА-дарының анти-*B. abortus 19* сарысуына қатысты антигенділігі.

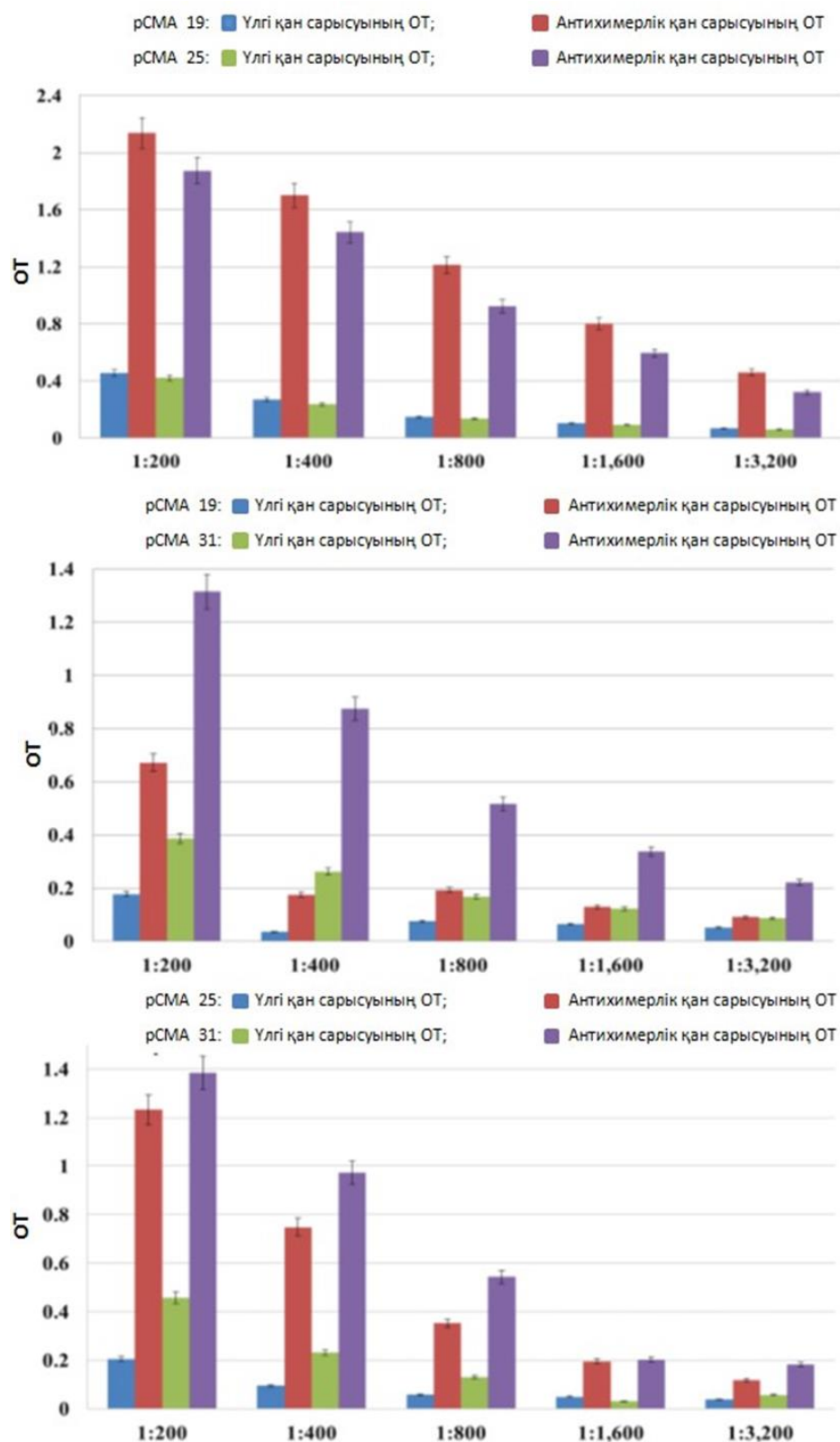
Жанама-ИФТ антиген ретінде қолданылатын бруцелланың рСМА					
Жалқы рекомбинантты ақуыздар			Мультипротеинді рекомбинантты		
			антигендер		
рСМА19	рСМА25	рСМА31	рСМА19+25	рСМА19+31	рСМА25+31
<i>B. abortus 19</i> штаммының тұтас жасушаларына қарсы антиденелердің титрі					
1:1,600	1:1,600	1:6,400	1:1,600	1:12,800	1:12,800

Залалсыздандырылған (инактивирленген) бактерия жасушаларымен гипериммунделген қоянның антиденелері қан сарысуының 1:12800 дейінгі сұйылтынымында рСМА19+31 және рСМА25+31 ақуыздарымен әрекеттесе алды, алайда жалқы рекомбинантты ақуыздарға (рСМА19 және рСМА25) немесе рСМА19+25-ке қарсы антиденелер титрі 1:1600 аса алмады. Бұл деректер қолданылған рСМА-дардың *E. coliBL21* өндіргіш штаммымен белсенді түрде синтезделінетінін көрсетеді.

Мультипротеиндердің экспрессиясы мақсатты өнімдердің құрамындағы гистидинге қарсы моноклоналды антиденелерді (His-TagMAb) вестерн-блоттингте қолдана отыра да расталды.

Құрастырылған рСМА-дар жеткілікті дәрежеде иммуногенділік қасиеттерін көрсетті, себебі ақуыздардың ТеАФ және БФЕ-індегі суспензияларымен екі рет егілген тышқандардан 28-ші тәулікте алынған қан сарысуларында рСМА19+25, 19+31 және/немесе 25+31 қарсы антиденелер тиісінше 1: 3940 (+ 32,0%; -24,2%), 1: 1840 (+ 52,6%; -34,4%) және 1: 1040 (+ 65,9%; -39,7%) титрлерінде анықталды. Көңіл аударатын мәселе - рСМА19+25-тің иммуногенділігінің рСМА19+31 ($p < 0,05$) және рСМА25+31-мен ($p < 0,01$) салыстырғанда біршама жоғары болуы.

Тышқандардың аталмыш антихимерлік сарысулары ж-ИФТ-ында жалқы рСМА-ының антигенділігін зерттеу үшін қолданылды (25-шы сурет).



25-шы сурет- Мультипротеиндерге қарсы 28-ші күні алынған тышқан сарысуларында *Brucella*-ның жалқы рСМА-ының антигенділігі. ж-ИФТ/рСМAs19, 25 және/немесе 31 нәтижелері нақты көрсетілген. (a) рСМА19 және рСМА25, (b) рСМА19 және рСМА31 және (c) рСМА 25 және рСМА 31

Химерлік ақуыздарға қарсы антиденелер рСМА19, 25 және/немесе 31 қатысты белсенділік танытты. Сарысу түрлеріне байланысты олардың титрлері 1:170- тен 1:800-ге (+24,0%; -19,7%) дейінгі аралықта болды. Анти-рСМА19+25-ке қарсы антиденелердің, басқа екі антиденелерге қарағанда, гомологиялық жеке ақуыздарға (рСМА19-бен рСМА25-ке) қарсы иммунореактивтілігі жоғарырақ болып, оларды тиісінше 1:800 (+24,0%; -19,7%) және 1:610 (+15,7%; -13,5%) титрлеріне дейін анықтай алды ($p < 0,05$).

Бруцелланың химерлік ақуыздары *Brucella*-ның жалқы рСМА-на қарсы алынған тышқан антисарысуларымен әрекеттесе алды (8-ші кесте).

8-ші кесте – Бруцелланың жалқы рСМА-дарына қарсы антиденелеріне мультипротеиндердің антигенділігі

ж-ИФТ қолданылған тышқананти-рСМА сарысулары					
анти-рСМА19 сарысуы		анти-рСМА25сарысуы		анти-рСМА31сарысуы	
Антигендердің түрлері					
рСМА19 +25	рСМА19 +31	рСМА19 +25	рСМА25 +31	рСМА19 +31	рСМА25 +31
1:240 (7.2%; -6.7%)	1:240 (15.7%; -13.5%)	1:400 (15.7%; -3.5%)	1:460 (7.2%; -6.7%)	1:740 (24.0%; -9.7%)	1:460 (24.0%; -9.7%)

8-ші кестеле берілген нәтижелер ақуыздарды құрастыру мақсатында қолданылған СМА-ының фрагменттері өздерінің антигенділігін гибриді құрылымның құрамында сақтап қалғандықтарын көрсетеді. Оған дәлел ретінде құрама ақуыздың тұтас жалқы ақуыздарға телімді антиденелермен танылуын айтуға болады. Қолданылған антисарысулардың титрлері арасында статистикалық мәні бар айырмашылық болмады, тек анти-рСМА31 сарысуындар СМА19+31 гибриді антигеннің құрамындағы гомологиялық ақуызға қарсы антиденелер титрі 1:740-ға жетті ($p < 0,05$) көрсетті.

Құрастырылған мультиэпитопты ақуыздар тышқан моделінде өздерінің иммуногенділігін көрсетті, өйткені имунделген зертханалық жануарлардың сарысу үлгілілеріндегі антиденелер жұпталған ақуыздармен айтарлықтай жоғары сұйылтылымдарында әрекеттесе алды (9-шы кесте).

9-шы кесте - Бруцеллалардың мультиэпитопты ақуыздарының иммуногенділігі

Антиде титрлері	ж-ИФТ қолданылған антигендер		
рСМА25/31	рСМА25+19	рСМА19+31	
ОТз/ОТб көрсеткіштері			
1: 200	1,75±0,11	4,82±0,25	3,93±0,20
1: 400	2,09±0,15*	5,39±0,14	4,66±0,20
1: 800	1,76±0,19	4,26±0,26	5,11±0,11
1: 1600	1,46±0,20	3,07±0,17	4,37±0,18

9-шы кесте жалғасы

1: 3200	1,21±0,09	2,36±0,17*	3,58±0,16
1: 6400	1,34±0,26	1,5±0,09	2,65±0,20*
1: 12 800	1,37±0,12	1,0±0,08	1,89±0,15
Антиденелердің орташа титрі	1: 1040 (+ 65,9%; -39,7%)	1 : 3940 (+ 32,0%; -24,2%)	1: 1840 (+ 52,6%; -34,4%)

Көңіл аударатын мәселе - рСМА25+/19 және рСМА19+31 иммуногенділігінің рСМА25/31-мен салыстырғанда айтарлықтай жоғары болуы ($P < 0,05$). Бұған дәлел ретінде ақуыздарға қарсы антидене титрлері мен олардың ОТз/ОТб салыстырмалы көрсеткіштерін айтуға болады.

Рекомбинантты ақуыздар негізіндегі ж-ИФТ-дың телімділігі, нақтылығы және сезімталдығы бруцеллезге оң ($n=34$) және/немесе теріс нәтижелі ($n=43$) қан сарысуларын қолдана отыра зерттелді (10-шы кесте).

10-шы кесте -*Brucella*-ның рСМА-дарының ж-ИФТ-ында РБС-мен салыстырмалы диагностикалық бағасы

РБС (+) сарысу ($n=34$)	РБС (-) сарысу ($n=43$)	Жанама ИФТ сипаттамасы				
		Антиген-дер	Сезім-талды-лығы, %	Телімді-лігі, %	Нақ-ты-лығы, %	ОТз/ОТб
ж-ИФТ(+)	ж-ИФТ(-)					
30	37	рСМА19	88.2	86.0	87.0	4.7±0.4
16	40	рСМА25	47.1	93.0	72.7	2.3±0.1
33	34	рСМА31	97.1	79.1	87.0	3.0±0.3
34	41	рСМА19+25	100	95.3	97.4	4.7±0.1
34	42	рСМА19+31	100	97.7	98.7	5.1±0.1
34	43	рСМА25+31	100	100	100	2.9±0.2

Сезімталдығы = жанама-ИФТ (+)/РБС (+)×100; Телімділігі = жанама-ИФТ (-)/РБС (-)×100; Нақтылығы = жанама-ИФТ (+) плюс ИФТ (-)/РБС (+) плюс РБС (-)×100; зерттелетін үлгілердің ОТз=ОТб; бақылау үлгілері ОТз=ОТб, жанама-ИФТ=жанама иммуноферменттік талдау, РБС=Роз-Бенгал сынама

Мультипротеиндер негізіндегі ИФТ зерттеуге алынған үлгілерді тексеріс кезінде максималды сезімталдық және 95,3-100% аралығындағы телімділік пен нақтылықты көрсетті. Ал, осы көрсеткіштер антиген ретінде жалқы рСМА-ды қолданғанда тиісінше 88,2-97,1%, 79,1-93,0% және 72,7% -87,0%-дан аспады. ОТз/ОТб орташа мәніне қарайтын болсақ, рСМА19+31 басқа екі ақуыздарға қарағанда *Brucella*-телімді антиденелермен анағұрлым берік байланысқа түсе алды: рСМА19+25 ($p < 0,05$) және рСМА25+31 ($p < 0,01$).

Бруцелланың рСМА-ның серологиялық әлеуеті ірі қара малдың 89 сарысуында зерттелді. Бұл үлгілердің 77-і дәстүрлі серологиялық реакциялар

бойынша бруцеллезге оң нәтиже берген індеттің жаңа ошағындағы сиырларға тиесілі болды, ал 12-і тәжірибелік жолмен жұқтырылған сиырлардан алынған болатын (11 кесте).

11 кесте–*Brucella*-ның рСМА-дарының серологиялық әлеуеті

ж-ИФТ антиген ретінде қолданылған <i>Brucella</i> -ның рСМА-дары					
Жалқы рекомбинантты ақуыздар			Мультипротеиндер		
рСМА19	рСМА25	рСМА31	рСМА19+25	рСМА19+31	рСМА25+31
АР және КБР брйынша індеттің жаңа ошағындағы серопозитивті сиырлардан (n=77)рСМА-дарға қарсы антиденелердің ж-ИФТ-да табылуы, бас (%)					
43 (55.8)	35 (45.5)	46 (59.7)	49 (63.6)	73 (94.8)	76 (98.7)
ОТз/ОТб					
3.0±0.1	3.1±0.1	2.9±0.1	2.7±0.1	4.3±0.2	3.4±0.1
Тәжірибе жүзінде жұқтырылған сиырлардан (n=12) инфекцияның 14-ші күні рСМА-дарға телімді антиденелердің табылуы, бас (%)					
12 (100)	8 (66.7)	7 (58.3)	12 (100)	12 (100)	12 (100)
ОТз/ОТб					
6.9±3.0	2.9±1.8	2.5±1.9	2.3±0.4	2.6±0.5	2.6±0.5

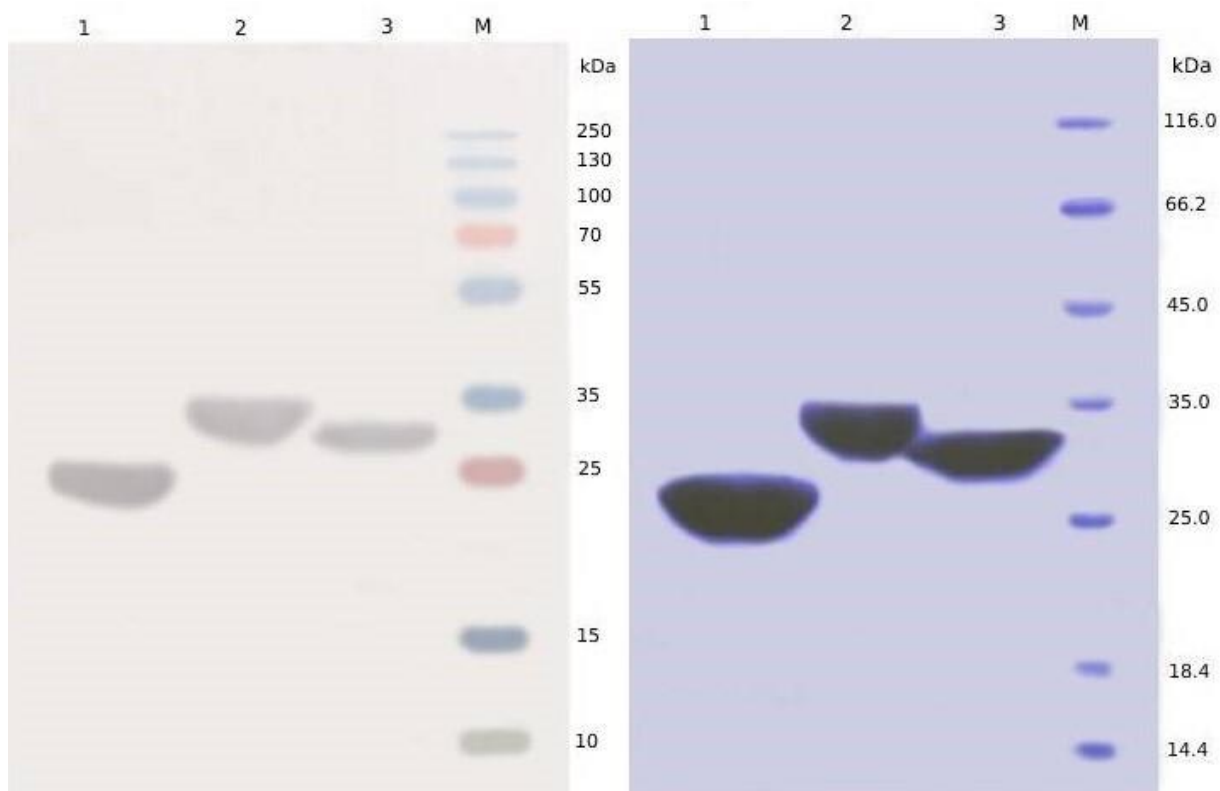
Бруцеллездің жаңа ошағындағы сиырлардың қан сарысуларындағы антиденелермен рСМА19+31 және рСМА25+31 ақуыздары жақсы әрекеттесіп, өздерінің жоғарғы антигенділіктерін көрсетті (тиісінше, 94,8% және 98,7%). Бұл көрсеткіш рСМА19+25 және жалқы рСМА-дарында біршама төмен болды. Маңызды мәселе - ИФТ/рСМА19+31 сыналмының ОТз/ОТб орташа мәні жалқы және басқа химерлік антигендермен салыстырғанда айтарлықтай жоғары болды ($p < 0,01$).

Мультиэпитоптық және рСМА19 ақуыздарына қарсы антиденелер тәжірибелік түрде бруцеллезбен жұқтырылған барлық мал басында індеттің 14-ші күні анықталды. Алайда, ж-ИФТ/рСМА25 және ж-ИФТ/рСМА31 сыналымдары оң нәтижелерін мал басының тиісінше, 66,7% және 58,3%-да ғана көрсетті.

Сонымен, зерттеулеріміздің нәтижесінде біз *Brucella* тұқымына жататын бактериялардың СМА-ның иммунодоминантты аймақтарынан құрастырылған рекомбинантты ақуыздардың жұптастырылған 3 мультиэпитоптық ақуыздарын жақсы экспрессиялай алатын ішек таяқшасының штаммдары алынды. Бруцеллездің серологиялық балауын жетілдіруде мұндай гибриді ақуыздардың жалқы рСМА-ымен салыстырғанда біршама артықшылықтары бар екендігі дәлелденді.

2.2.4 Сиыр және қой бруцеллезін балауда мультипротеиндер негізіндегі иммунды-ферменттік талдау нұсқаларының диагностикалық құндылығын зерттеу

His-Trap колонкасы көмегімен тазартылған *Brucella*-ның химерлік рСМА-дарының телімділігі иммуноблоттинг тәсілімен зерттелді (26-ші сурет).



26-ші сурет – Гистидинге қарсы моноклоналды антиденелермен (анти-HisTagMab) (сол жақта) және *B. abortus* 544 вирулентті штамымен тәжірибелік жолмен жұқтырылған сиырдың сарысуымен (оң жақта) иммуноблоттинг
 1-ші жолақ - рСМА25 + 31; 2-ші жолақ - рСМА19 + 25;
 3-ші жолақ - рСМА19+31; М– Маркерлер

26-ші суреттің нәтижелеріне сүйенсек, анти-HisTagmAb мол.с.35, 32 және 27 кДа болатын тиісінше рСМА19+25, рСМА19+31 және рСМА25+31 ақуыздарын анықтаған. *B. abortus* 544 вирулентті штамымен тәжірибе жүзінде жұқтырылған сиырдың қан сарысуындағы антиденелер барлық ақуыз фракцияларымен өте айқын байланысқа түсіп отыр. Бұл нәтижелер рекомбинантты ақуыздардың бруцеллалардың табиғи ақуыздарымен аутенттілігін (ұқсастығын) дәлелдейді.

РБС, КБР және коммерциялық ИФТ (к-ИФТ) (INgezim *Brucella* Compac 2.0, Испания) бойынша бруцеллезге серологиялық оң нәтижелер көрсеткен сиырлардың қан сарысулары химерлік ақуыздарға негізделген ж-ИФТ-дың сезімталдығын, телімділігін және дәлділігін анықтауда қолданылды (12-ші кесте).

12 кесте – Мультипротеиндерге негізделген ИФТ-ының сезімталдығын, телімділігін және дәлділігін сиыр бруцеллезінің балауында қолданылған РБС, КБР және к-ИФТ нәтижелерімен салыстыра отыра анықтау нәтижесі

РБС/КБР/к-ИФТ бойынша бруцеллезге негативті мал саны (n=88/88/88)				
РБС/КБР/к-ИФТ бойынша бруцеллезге позитивті мал саны (n=36/50/50)				
Антигендер	ж-ИФТ-ының диагностикалық сипаттамасы			
	Сезімталдылығы, %	Телімділігі, %	Дәлділігі, %	ОТз/ОТб
pCMA19 + 25	83/78/78	99/99/99	94/91/91	2,5 (0.538±0.084/ 0.211±0.096)
pCMA19 + 31	89/78/78	99/99/99	97/92/92	2,4 (0.725±0.079/ 0.297±0.089)
pCMA25 + 31	58/54/54	94/94/94	84/80/80	2,3 (0.526±0.056/ 0.229±0.078)

Сезімталдылығы = ж-ИФТ (+) / РБС, КБР немесе б-ИФТ (+) × 100;
Телімділігі = ж-ИФТ (-) / РБС, КБР немесе б-ИФТ (-) × 100;
Дәлділігі = ж-ИФТ (+) қосу ж-ИФТ (-)/РБС, КБР немесе б-ИФТ (+) қосу РБС, КБР немесе б-ИФТ (-)×100;
ОТз- Зерттелген сарысулардың ОТ; ОТб- Бақылау үлгілерінің ОТ.

12-ші кестенің мәліметтері құрастырылған ақуыздарды антиген ретінде қолдану сыналымға әртүрлі диагностикалық қасиеттерді беретіндігін көрсетеді. РБС нәтижелерімен салыстырғанда ж-ИФТ-дың максималды сезімталдығы (89%), телімділігі (99%) және дәлділігі (97%) pCMA19+31-ді пайдалану кезінде байқалды. Сыналып отырған иммунды талдаудың сезімталдығы мен дәлділігі КБР және к-ИФТ салыстырғанда біршама төменірек болды (тиісінше 78% және 92%). ж-ИФТ/pCMA25+31 вариантының телімділігі жоғары болды (94%), дегенмен иммунды талдаудың бұл нұсқасының сезімталдылығы төмен болды (54-58%).

Бруцеллез балауындағы дәстүрлі реакцияларды және ИФТ қолдану арқылы қойдың қан сарысуларын серологиялық зерттеу нәтижелері 13 кестеде көрсетілген.

13 кесте – Мультипротеиндерге негізделген ИФТ-ының сезімталдығын, телімділігін және дәлділігін қой бруцеллезінің балауында қолданылған РБС, КБР және к-ИФТ нәтижелерімен салыстыра отыра анықтау

РБС/КБР/к-ИФТ бойынша бруцеллезге негативті мал саны (n=88/88/88)				
РБС/КБР/к-ИФТ бойынша бруцеллезге позитивті мал саны(n=45/50/50)				
Антигендер	ж-ИФТ-ының диагностикалық сипаттамасы			
	Сезімталдылығы, %	Телімділігі,%	Дәлділігі, %	ОТз/ОТб
pCMA19 + 25	76/72/72	99/99/99	91/89/89	3,4 [0.341±0.034/ /0.100±0.042]
pCMA19 + 31	44/42/42	100/100/100	81/79/79	2,5 [0.423±0.029/ /0.166±0.036]
pCMA25 + 31	22/20/20	99/99/99/99	73/70/70	4,9 [0.402±0.020/ /0.082±0.025]
Сезімталдылығы = ж-ИФТ (+) / РБС, КБР немесе б-ИФТ (+) × 100; Телімділігі = ж-ИФТ (-) / РБС, КБР немесе б-ИФТ (-) × 100; Дәлділігі = ж-ИФТ (+) қосу ж-ИФТ (-)/РБС, КБР немесе б-ИФТ (+) қосу РБС, КБР немесе б-ИФТ (-)×100; ОТз- Зерттелген сарысулардың ОТ; ОТб- Бақылау үлгілерінің ОТ.				

Сыналған 3 антигендердің барлығы ж-ИФТ-ына жоғары телімділікті қамтамасыз етті (99-100%), дегенмен оның сезімталдығы қолданылған ақуыздардың түріне байланысты біршама ауытқып отырды. Иммунды талдаудың салыстырмалы түрде жоғары сезімталдылығы пен дәлділігі (тиісінше 72-76% және 89-91%) ж-ИФТ/pCMA19+25 қойылымында байқалды. Айта кететін болсақ, pCMA25+31 басқа ақуыздармен салыстырғанда қой бруцеллезін балауда да төмен сезімталдылық танытты (20-22%), алайда оның ОТз/Отб көрсеткіші, яғни аффинділігі жоғарырақ болды.

Brucella-ның құрама pCMA-дарға негізделген ж-ИФТ-ының диагностикалық маңызын бағалау сиырларды РБС-ында бруцеллезге тексеру кезінде (серологиялық зерттеудің 1-ші кезеңінде) алынған нәтижелермен салыстыра отыра анықталды (14-ші кесте).

14-ші кесте – Жаңа індет ошағындағы сиырларды РБС және рСМА-дар негізіндегі ИФТ әдістерімен серологиялық зерттеу нәтижелері

РБС нәтижелері	Қан сарысуларының саны	Бруцелланың мультэпитопты рСМА негізіндегі ж-ИФТ нәтижелері:		
		19 + 25	19 + 31	25 + 31
теріс нәтижелі қан сарысулары	10	Телімділігі,%		
		100	100	70
Оң нәтижелі қан сарысулары	65	Сезімталдылығы,%		
		34	80	80
Оң нәтижелі қан сарысуларын (n=65) әртүрлі сұйылтымдарында зерттеу нәтижелері:				
=1:2	3	0	33	67
=1:4	11	0	36	36
=1:8	14	7	64	71
=1:16	8	25	100	100
≤1:32	29	66	100	97
ж-ИФТ дәлдігі, %		43	81	79
Сезімталдығы= ж-ИФТ(+)/РБС (+)×100; Телімділігі= ж-ИФТ(-)/РБС (-)×100; Дәлділігі =ж-ИФТ(+) қосуИФТ (-)/РБС (+)қосу РБС (-)×100.				

14-ші кестенің деректері ж-ИФТ/рСМА19+25 және ж-ИФТ/рСМА19+31 варианттары өздерінің телімділіктері бойынша РБС-нан кем түспеді. Дегенмен иммунды талдаудың бірінші нұсқасы сезімталдығы бойынша айтарлықтай төмен нәтиже көрсетті (34%). Көңіл аударатын мәселе – РБС-ның антигеніне қарсы антидене титрлерінің өсуі ж-ИФТ сезімталдығының жоғарылуымен пара-пар келіп отыр. Мысалы, антидене титрі 1:2-ге тең қан сарысуларын зерттегенде рСМА19+25, рСМА19+31 және рСМА25+31 негізіндегі ж-ИФТ-дың сезімталдығы тиісінше 0%, 33% және 67% болса, ал антидене титрі 1:32 болатын сарысуларды тексерген кезде сынаманың бұл көрсеткіші тиісінше 66%, 100% және 97%-ке дейін көтерілді. Сыналып отырған антигендер арасында ең қолайлысы - максималды телімділік пен 80% сезімталдылықты көрсетіп отырған рСМА19+31 ақуызы болып отыр. ж-ИФТ/рСМА19 + 25 нұсқасын қолдану сыналымның дәлділігінің айтарлықтай төмендеуіне (43%) әкелді.

Ұқсас нәтижелер бруцеллез жұқтырған отардағы қойлардың қан сарысу үлгілеріне салыстырмалы серологиялық зерттеулер жүргізген кезде де байқалды (15-ші кесте).

15-ші кесте – Жаңа індет ошағындағы қойларды РБС және рСМА-дар негізіндегі ИФТ әдістерімен серологиялық зерттеу нәтижелері

РБС нәтижелері	Қан сарысуларының саны	Бруцелланың мультиэпитопты рСМА негізіндегі ж-ИФТ нәтижелері:		
		19 + 25	19 + 31	25 + 31
теріс нәтижелі қан сарысулары	20	Телімділігі, %		
		50	70	40
оң нәтижелі қан сарысулары	55	Сезімталдығы, %		
		96	86	86
Оң нәтижелі қан сарысуларын (n=55) әртүрлі сұйылтымдарында зерттеу нәтижелері:				
=1:2	5	100	80	80
=1:4	12	92	83	75
=1:8	12	92	58	75
=1:16	8	100	100	88
≤1:32	18	100	100	100
ж-ИФТ дәлділігі, %		84	81	73
Сезімталдылығы = ж-ИФТ(+)/РБС (+)×100; Телімділігі = ж-ИФТ(-)/РБС (-) ×100; Дәлділігі = ж-ИФТ(+) қосу ИФТ (-)/РБС (+) қосу РБС (-)×100.				

15-ші кестеде көрсетілгендей, ж-ИФТ-дың нұсқалары антидене титрлері 1:16-ға тең немесе одан да жоғары болған 26 қой сарысуларын (35%) зерттегенде 100%-дық сезімталдықты көрсетті, дегенмен олар телімділігі жағынан РБС кемшін түсті. Қой малын серологиялық зерттеу кезінде де ж-ИФТ/рСМА19+31 варианты бұл сыналымның басқа екі нұсқасымен салыстырғанда жоғары телімділікпен сипатталды (70%), алайда оның сезімталдығы ж-ИФТ/рСМА19+25-пен салыстырғанда (96%) төменірек болды (86%). Қой қан сарысуларын бруцеллезге ж-ИФТ-ымен зерттеу кезінде ең төмен телімділікті рСМА25+31 ақуызы көрсетті (40%).

Мультипротеинді рекомбинантты антигендердің негізіндегі ж-ИФТ-ының диагностикалық құндылығын зерттеу барысында алынған нәтижелерді қорытындылай келе, сиыр мен қой малын бруцеллезге тексеру кезінде бұл сыналым варианттарының әртүрлі сезімталдық пен телімділік көрсеткенін айтуға болады. Қолданылған гибридті ақуыздардың үшеуі де бруцеллездің серологиялық ауруының балауын жетілдіріуде қолданыс табу мүмкін. Дегенмен, олардың арасынан иммунологиялық реакцияларға лайықты кандидат ретінде рСМА19+31 антигенін айтуға болады.

2.2.5 Бруцеллезді балауға арналған ИФТ жиынтығының тәжірибелі үлгісін салыстырмалы сынау

Brucella-ның рСМА19+31 антигені негізінде дайындалған ИФТ жиынтығы тәжірибелі үлгісінің (4-ші Қолданба) құндылығы дәстүрлі серологиялық реакциялар (РБС, АР және КБР) және бактериологиялық талдау нәтижелерімен салыстырыла отыра бағаланды. Қосымша серологиялық сыналым ретінде ҚР ветеринариялық препараттар тізілімінде тіркелген шетелдік ИХТ-сыналым –*Brucella* LTFLOW(Литва) қолданылды.

Зерттеулеріміздің бұл бөлімінде 38 бас сиыр малының қан сарысулары қолданылды. Олардың 26-ы індеттен таза "Global Beef Products" ЖШС-ның бруцеллезге қарсы *B. abortus* RB-51 штаммымен бір ай бұрын егілген сиырларынан, ал 10-ы эксперименталды түрде *B. abortus* 544 штаммымен жұқтырылған ірі қара малдан алынды. Серологиялық зерттеулерде бақылау ретінде екпе алмаған 2 бұқаның қан сарысулары қолданылды (16-шы кесте).

16-шы кесте – ИФТ жиынтығы тәжірибелі үлгісінің құндылығын анықтау

Зерттеуге алынған мал саны	Серологиялық сыналымдар						ИФТ жиынтығы
	РБС	АР	КБР	<i>Brucella</i> LTFLOW нәтижелері:			
				5 мин. кейін	10 мин. кейін	< 10 мин. кейін	
Қан сарысуларында <i>Brucella</i> -ға телімді антиденелер анықталған мал басы							
<i>B. abortus</i> RB-51 вакцинасымен иммунделген сиырларлар							
26	15	0	0	17	17	14	16
Бруцеллезге қарсы екпе алмаған тұқымдық бұқалар							
2	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. abortus</i> 544 штамымен жұқтырылған сиырлар							
10	10	0	0	8	8	7	10
Ескерту: <i>Brucella</i> LTFLOW сынамасының 10 мин. аралығындағы нәтижелері есепке алынды; <i>Brucella</i> өсіндісі жұқтырылған барлық мал басынан бөлініп алынды.							

ИФТ жиынтығының тәжірибелі үлгісі РБС-ның барлық нәтижелерін растап, қосымша 1 сиырдың қан сарысуынан *Brucella* бактерияларына тән антиденелердің бар екендігін анықтады. Вакцинацияланған сиырлардың ішінде 15 бас (58%)РБС-ында оң нәтиже көрсетсе, *Brucella* LTFLOW бойынша 17 сиыр (63%) бруцеллезге серопозитивті болды. ИХТ бойынша оң нәтижелі сиырлардың 5-де антиденелер РБС-ында табылмады, алайда 3 РБС-позитивті малда шетелдік сыналым теріс реакция көрсетті.

Сиыр малын бруцеллезбен жұқтыру үшін қолданылған *B. abortus* 544 штаммы бактериологиялық зерттеулер кезінде тәжірибедегі барлық жануарлардың патологиялық материалдарынан бөлініп алынды. Жұқтырылған барлық мал басы ИФТ жиынтығы бойынша серопозитивті болып танылды, алайда *Brucella* LTFLOW-сыналымы тек 8 баста ғана бруцеллезге қарсы антиденелерді айқындай алды.

ИФТ жиынтығы мен *Brucella* LTFLOW сыналымының салыстырмалы сипаттамалары 17-ші кестеде келтірілген.

17-ші кесте – ж-ИФТ жиынтығымен *Brucella* LTFLOW сыналымын бағалау

Серологиялық сыналымдардың сипаттамалары	<i>Brucella</i> LTFLOW		ИФТ жиынтығы	
	поствакциналық антиденелер	поствакциналық және постинфекциялық антиденелер	поствакциналық антиденелер	поствакциналық және постинфекциялық антиденелер
Сезімталдығы, %	113	69	107	72
Телімділігі, %	82	80	91	100

Ескерту:

ИФТ және LTFLOW сезімталдығы және телімділігі РБС нәтижелеріне қатысты анықталды;

ИФТ сезімталдылығы= $\text{ИФТ}(+)/\text{РБС}(+)\times 100$; телімділігі= $\text{ж-ИФТ}(+)/\text{БЗ}(+)\times 100$;

Brucella LTFLOW сезімталдылығы = $\text{Brucella LTFLOW}(+)/\text{РБС}(+)\times 100$; телімділігі= $\text{Brucella LTFLOW}(+)/\text{БЗ}(+)\times 100$;

Сыналымдардың сезімталдылығын анықтаған кезде поствакциналық және постинфекциялық антиденелер табылған мал басы есепке алынды.

ИФТ жиынтығы тәжірибелі үлгісі *Brucella* LTFLOW сыналымынан өзінің телімділігі жағынан ғана емес (тиісінше 100% және 80%), сонымен қатар сезімталдығымен де басым түсті (тиісінше 72% және 69%).

Бруцеллезді балауға арналған ИФТ жиынтығының прототипін белгілі серологиялық реакциялар мен бактериологиялық талдау әдістерімен салыстырмалы сынау нәтижелері оның диагностикалық практикада қолдану мүмкіндігін дәлелдеп отыр.

2.3 Зерттеу нәтижелерін талқылау

Бруцеллез эндемикалық зооноз ретінде ҚР-ын айтарлықтай экономикалық және әлеуметтік маңызы бар шығындарға ұшыратып отыр. Бруцеллездің клиникалық белгілерінің сан алуандығы, серологиялық сыналымдардың төмен сезімталдығы, инфекцияның созылмалы түрде өтуі-бруцеллез ауруының көптеген жағдайларда тіркелмей қалуына себепкер болып отыр [205]. Табиғатта ауру қоздырғышының сақталуы ең алдымен сиыр мен

қой малы арасындағы эпизоотиялық үрдіске байланысты болып келеді. Міне, сондықтан да аталмыш індетпен күрестің басты буыны - ауру жұқтырған малды уақытылы дер кезінде дәл анықтап, оқшаулау болып табылады.

Ветеринария және денсаулық сақтау үшін бруцеллездің маңыздылығына қарамастан, өткен ғасырдың басында (АР және КБР) және оның екінші жартысында (РБС және т.б.) әзірленген серологиялық сынақтар бүгінгі күнге дейін диагностиканың негізгі әдістері ретінде қолданылып келе жатыр. Қазіргі таңда ИФТ және ИХТ сияқты таңбаланған антигендерді және/немесе антиденелерді пайдалануға негізделген жоғары сезімтал иммунологиялық әдістер бруцеллезді диагностикалау практикасына енгізіле бастады.

Заманауи сынақтардың кеңінен қолдануына негізгі кедергі — серологиялық әлеуеті тұрғысынан алғанда *Brucella* тұқымына тән антигендердің болмауы. Дәстүрлі серологиялық сынақтар сияқты, ветеринарлық препараттар нарығындағы қол жетімді ИФТ жиынтықтар бруцеллалардың S-ЛПС антигеніне қарсы антиденелерді анықтауға негізделген, ал бұл жағдай басқа грам теріс бактерияларға бағытталған антиденелердің әсерінен айқыш-реакцияны тудырып, жалған оң нәтижелерге әкелуі әбден мүмкін. Осыған орай, бруцеллездің серологиялық балауы үшін қолайлы антигенді іздестіру - қазіргі ветеринария ғылымының ең өзекті мәселелердің бірі болып отыр.

Соңғы 30 жыл ішінде бруцеллалардың иммунологиялық тұрғыдан белсенді ақуыздарын анықтауға бағытталған көптеген әрекеттер жасалды. Солардың ішінде гендік инженерияның жетістіктері қоздырғыштың рекомбинантты ақуыздарын алуға және оларды аурудың серологиялық диагностикасында құндылығын тексеруге мүмкіндік берді. Олардың алғашқылары - рСМА25 [183], рСМА31 [206] және рСМА19 [207] *E. coli* жасушаларында клондалып, экспрессияланған болатын. Бұл рекомбинантты ақуыздар бүгінгі күні жаңа вакциналарды дайындау жұмыстарында да сыналып жатыр [208, 209]. Бұл ақуыздардың бруцеллездің серологиялық балауындағы әлеуеті әлі де болса жеткіліксіз зерттелген, ал қол жеткізілген нәтижелер бір-бірімен сәйкес келе бермейді. Мысалы, алғашқы жұмыстардың бірінде қолданылған 8 рекомбинантты ақуыздардың ешқайсысы, оның ішінде 5-і рСМА (рСМА10, рСМА16, рСМА19, рСМА25 және рСМА36) бруцеллезбен эксперименталды және табиғи түрде жұқтырылған сиырлар мен қойлардың сарысу антиденелерімен әрекеттесе алмаған [155].

Рекомбинантты рСМА31 антигенділігі адамның, сондай-ақ бруцеллез жұқтырған жануарлардың сарысуларын пайдалана отыра, ИФТ-да зерттелген болатын. Бруцеллаға тән антиденелер адамдардың 48% - ында, ал жұқтырылған қойлардың 61% және иттердің 87% - ында анықталған [210].

Бірқатар зерттеушілер бруцеллалардың жалқы рСМА-ның басқа рекомбинантты ақуыздармен бірге пайдалағанда ықтимал пайдалылығын елемеуге болмайды деп санайды. Мәселен, Navarro-Sato et al. [156] *E. Coli* жасушаларында *Brucella ovis*-тің рСМА31-ін экспрессиялап, бұл ақуыздың жануарлардың *Brucella*-оң сарысуларына қатысты жоғары антигенділігін

байқаған. Бұл ақуыз ешкі мен қой малын серологиялық зерттеуде ИФТ-ына қажетті сезімталдықты қамтамасыз ете алмаған, алайда РБС-мен салыстырғанда сыналымға жоғары телімділікті дарытқан [211].

Біздің зерттеулерімізде қолданылған бруцеллалардың рСМА25, рСМА31 және периплазмалық ақуыздары ақ тышқандарға иммуногенді болып келді. Сыртқы мембраналық ақуыздарға қарсы антиденелердің максималды титрлері 21-ші күні, антигендердің үшінші инъекциясынан кейін байқалды. Антидене түзу жауабы Cu-ZnСОД-пениммунделген тышқандарда салыстырмалы түрде төменірек болды. Айталық, тышқандардың бұл тобында антиденелердің ең жоғары титрлері 28-ші күннен кейін, яғни антигенді төртінші рет енгізгеннен соң тіркелді. ВР26 периплазмалық ақуызы сыналған препараттардың арасында салыстырмалы түрде жоғары иммуногенділікті көрсетті. Мысалы, бұл антигенге антиденелерінің қарқынды түзілуі 15-ші күні, яғни тышқандарды екінші рет иммундеуден кейін, байқалды. Біздің деректеріміз ВР26-ның иммунологиялық үстемдігін және оны адам мен сиыр бруцеллезінің серологиялық диагнозында қолдану мүмкіндігін жазған басқа зерттеушілердің тұжырымдарына сәйкес келеді [159,163]. Жұмысымызда қолданылған бруцелланың ерігіш ақуыздық препаратына (*Brucella*-ның ЕАП) қарсы тышқан сарысуының антиденелері рСМА25, рСМА31 және ВР26-пен өзара байланысқа түсіп *E.coli* жасушалары экспрессиялайтын рекомбинантты ақуыздардың түпнұсқалығын дәлелдеп берді. Біздің ойымызша, бұл 3 рекомбинантты ақуыздардың өзара ұқсас детерминанттары бар сияқты, өйткені олардың арасындағы антиденелермен айқыш реакциялар байқалды. *B. abortus* 19-ға қарсы қоян антиденелерінің біз қолданған барлық рекомбинантты ақуыздармен ж-ИФТ-ында әрекеттесуі де мақсатты өнімдердің *E.coli* BL21 жасушаларымен табиғи түрінде экспрессияланатынын растайды.

Бруцеллалардың рСМА19-ы Фрейд адьювантының көмегісіз тышқандардың антидене түзуін тудыра алатын иммуногенділігі жоғары ақуыз болып шықты. Иммуногенді ТеАФА немес ТФА суспензиясында бір рет енгізу иммундық жүйені ынталандырып, антидене титрлерін 1:800-ге дейін көтерілуіне алып келді. Алайда, бұл антиденелер сарысудың бастапқы сұйылтынымында рСМА25 және рСМА31-мен айқыш-реакцияға түсті. *Brucella*-ның рСМА19-на қарсы титрі 1:6400 болатын тышқанның гипериммунды сарысуы антигенді адьюванттармен қоса үшінші рет енгізгенде, яғни иммундеудің 28-ші күні алынды. Бұл сарысудың антиденелері рСМА25 және рСМА31-мен тиісінше 1:400 және 1:1600 сұйылтынымдарына дейін айқыш байланысқа түсе алды. Бұл деректер пайдаланылған рСМА құрылымдарында ұқсас эпитоптардың бар болуын болжайды. Сонымен қатар, айқыш-реакциялар ТФА құрамындағы бруцеллалармен ұқсас эпитоптары бар микобактерияларға қарсы антиденелердің түзілуімен де байланысты болуы мүмкінмен ұқсас эпитоптары болуы мүмкін байланысты болуы мүмкін. Қорыта айтқанда, рСМА19 ақуызы адьюванттың көмегісіз-ақ өзінің бір инъекциясынан соң телімді антиденелердің түзілуін тудыра алатын иммуногенді антиген екендігін көрсетті.

Зерттеулерімізде пайдаланылған рекомбинантты рСМА иммунологиялық белсенді түрінде *E. Coli* жасушаларында синтезделді және қоянның анти-*B. abortus* 19 (фенолмен залалсыздандырылған жасушалар), сондай-ақ тәжірибелі түрде бруцеллезбен жұқтырылған құнажынның анти-*B. abortus* 554 сарысуларымен анықталды. Қоянның сарысуының антиденелері иммуноблотингте қолданылатын барлық рСМА-мен байланысқа түсе алда, алайда рСМА25 және рСМА31-дің ақуыз жолақтарын бруцеллезбен жұқтырылған құнажынның антиденелері тани алмады. Денатурация нәтижесінде көптеген молекулалардың иммуногенділігінің біршама өсетіні белгілі. Бруцелла жасушаларының фенолмен инактивациясы қоздырғыштың табиғи түрінде иммундық жүйенің назарынан тыс жаңа эпитоптарының ашылуына әкелуі әбден мүмкін. Міне, сондықтан денатурацияға ұшырағын ақуыздар иммундық жүйенің гуморальды жауабын табиғи аналогтарында кездеспейтін детерминанттарына қарсы қоздыруы мүмкін [212]. Біздің ойымызша, СМА25 және СМА31-дің серологиялық маңызды эпитоптары бруцеллезбен жұқтырылған малдың иммундық жүйесі үшін СМА19-дың эпитоптарына қарағанда инфекцияның бастапқы кезеңінде бірден таныла қоймайды. Екіншіден, иммуноблот процедурасы кезінде орын алатын денатурация жағдайлары да рекомбинантты ақуыздардың үшінші құрылымына әсер етуі мүмкін. Одан қалды, ақуыздардың антигендік және/немесе иммуногендік қасиеттері *in vitro* және *in vivo* жағдайларында әр түрлі болып келуі де мүмкін [149].

рСМА19-ға қарсы антиденелер *B. abortus* 554 вирулентті штаммымен жұқтырылған барлық жануарларда тәжірибенің 14-ші күні табылды, ал рСМА25 ақуызына телімді антиденелер тек 28-ші күні ғана пайда бола бастады. Осы мерзімге дейін жануарлардың 25%-ында рСМА31-ге қарсы антиденелер табыла қоймады. Сонымен қатар, жұқтырылғаннан кейінгі 28-ші күні рСМА19-ға қарсы антиденелер титрлері басқа екі ақуызға тән титрлерге қарағанда едәуір жоғары болды. Бұл деректер рСМА19-дың үшінші топқа жататын бруцеллалардың басқа ақуыздарына қарағанда антигенділігінің біршама жоғары екендігін көрсетеді. Біздің нәтижелеріміз Letesson et al. қорытындыларына сәйкес келеді [150]. Зерттеушілер иммунды жауаптың минорлы ақуыздарға, соның ішінде рСМА19-ға, мажорлы ақуыздармен салыстырғанда сәл де болса күштірек болғанын жазған болатын. Авторлардың пікірінше, бұл жағдай рСМА19-дың жасушада орналасуына байланысты. Ол интегралды мембраналық ақуыз емес, жасушаның сыртқы бетіндегі липопротеин болып табылады [182].

Кейінгі зерттеулеріміз, СМА19 мажорлы СМА-дары сияқты індеттің жаңа ошақтарындағы сиырларды серологиялық зерттеу кезінде өзінің жоғары антигенділік қасиетін көрсетті. Баса айта кететін жағдай - рСМА-ге тән антиденелердің бруцеллезден таза табындағы *B. abortus* 19 штаммымен қайтара егілген сиырлардың жартысынан көбінде вакцинациядан кейін 10 ай ішінде анықталуы. Бұл бізге рСМА-ына қарсы антиденелерді бруцеллезбен

жұқтырылған малдар ғана емес, сонымен қатар вакцинацияланған жануарлар да түзейді деген қорытынды жасауға негіз береді.

Жалқы ақуыздарға (pCMA19, pCMA25 және/немесе pCMA31) негізделген ИФТ нұсқаларын қолдану сыналым сезімталдығының төмендеуіне әкелді. Бұл түсінікті де: бруцеллаларға қарсы антиденелердің барлық популяцияларына тән эпитоптар бір қоздырғыштың бір ақуызының құрамында бола алмайды. Алынған нәтижелер бізге 3 pCMA-дардан құрастырылған құрама ақуыздарды сиыр малыналғашқы вакцинация алдында серологиялық тексеруде сенімді антиген ретінде қолдануға болады деген қорытынды жасауға мүмкіндік берді.

Әдебиет деректеріне сүйенсек, бруцеллалардың pCMA-ның ЛПС-тен айырмашылығы, біріншіден, телімді антиденелерді айқаспалы-реактивті антиденелерден ажырата алуы [8]; екіншіден, зардапсыз штамм-өндірушілермен синтезделінеді; үшіншіден тұрақты антигендік қасиеттерге ие және, төртіншіден, иммунологиялық сыналымдарды стандарттауға жағдай туғызады [149].

Бруцеллалардың pCMA-дары, сөзсіз, серологиялық сынақтардың телімділігін қамтамасыз етеді, бірақ, біздің зерттеулеріміз көрсеткендей, бір ақуызды қолдану ИФТ сезімталдығын айтарлықтай төмендеуіне әкеледі [167, 214]. Бұл жағдайды біз бруцеллаларға бағытталған барлық антиденелерді патогеннің бір ақуызымен ғана анықтауға болмайтындығымен түсіндіреміз. Баса айта кететін мәселе – біздің алған нәтижелеріміз pCMA-дарын вакцина алмаған табындарда бруцеллез ауруына ұшыраған малды анықтау үшін ғана қолдануға болатындығын көрсетті. Біздің пікірімізбен басқа зерттеушілер де келіседі. Олардың ойынша, екпе алмаған малда *Brucella*-ға қарсы антиденелердің болуы ол әрқашан инфекцияның дәлелі болып табылады [215].

Зерттеу нәтижелерімізді қорытындылай келе, біз бірнеше ақуыздардан тұратын рекомбинантты антигенді бруцеллезге қарсы вакцина алмаған табында ауру малды нақты түрде анықтау үшін қолдануға болады деп санаймыз. Бұл ұсыныстың басты кемшілігі – мұндай серологиялық зерттеулердің қымбаттығы болып табылады, өйткені құрама антигенді алу үшін бірнеше pCMA-дарын өндіруші штамдар болуы керек және екі немесе одан да көп ақуыздарды тазарту мақсатында көптеген жұмыстар атқару керек. Сонымен қатар, мұндай құрама антигенді құрайтын әрбір жалқы ақуыздың әлсіз антигендік және/немесе басқа туыстас бактериялармен кросс-реактивті эпитоптары болуы мүмкін, оған қоса олар ИФТ-дың қатты фазасымен байланысу кезінде бір-бірімен кедергі де тигізеді. Осы мәселелерге орай, біз әрқайсысы мажорлы екі CMA-ның иммунодоминантты аймақтарынан тұратын *Brucella*-ның 3 түрлі антигенін жасап шығардық. Олар *E. coli* BL21 (DE3) штамының жасушаларында pET28 плазмидінің көмегімен сәтті түрде экспрессияланып, сиыр мен қой бруцеллезін серологиялық диагностикалау мақсатында ж-ИФТ-ында антиген ретінде сыналды. Зерттеу жұмыстарымызда pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+31 деген атауларға ие болған бұл құрылымдар *Brucella* ақуыздарының мол. с. 19 кДа, 25 кДа және 31 кДа болатын белсенді серологиялық бөліктерінен құрастырылды. *E. coli* BL21 (DE3) жасушалары өсіндіге ИПТГ-ны

қосқаннан кейін 6 сағат аралығында мақсатты ақуыздардың концентрациясын максималды деңгейге жеткізді.

Рекомбинантты ақуыздардың табиғи ақуыздардан айырмашылықтарының болуы әбден мүмкін. Алғашқылары экспрессия немесе тазарту кезеңдерінде кейбір функцияларды жоғалтып та алады. Одан қалды, иммуноблот жұмыстары рекомбинантты ақуыздардың құрылымын өзгерте де алады [149]. Құрама рекомбинантты антигендер қоянның анти-*B.abortus* 19 сарысуымен ж-ИФТ-ында және иммуноблотта әрекеттесе алды. Бұл олардың *E. coli* жасушаларында белсенді күйде экспрессияланатындығын көрсетеді.

Химерлік антигендер жақсы иммуногендік қасиеттерін көрсетті, өйткені олар ФТА-ының көмегінсіз екі инъекциядан кейін қарқынды түрде тышқандардың антидене түзу жауабын тудыра алды. Мультиэпитопты антигендерге қарсы түзілген антиденелер жалқы ақуыздармен, ал, керісінше, рСМА19, рСМА25 және/немесе рСМА31-ге тән антиденелер өздерінің эпитоптарын химерлік ақуыздардың құрамынан тани алды. Бұл нәтиже мультиэпитопты химерлердің түпнұсқалығын (аутенттілігін) дәлелдейді.

Бруцеллезге қарсы вакцина алған, сонымен қатар табиғи және/немесе эксперименталды түрде жұқтырылған сиыр малынан алынған *Brucella*-позитивті қан сарысулары ж-ИФТ-ында құрама ақуыздардың диагностикалық құндылығына баға беру үшін қолданылды. Зерттеу нәтижелері мультиэпитоптық ақуыздардың құрамында екпе алған және бруцеллезбен ауру малдардың антиденелерімен әрекеттесе алатын детерминанталардың бар екенін көрсетті. Сиырлардың поствакциналық және постинфекциялық, сондай-ақ қоянның анти-*B. abortus* 19 антиденелеріне қатысты мультиэпитопты рСМА19+31 және рСМА25+31 антигенділігі жалқы рСМА-ының және рСМА19+25-тің антигенділігімен салыстырғанда анағұрлым айқынырақ болды. Бір қызығы, соңғы антигеннің басқа ақуыздармен салыстырғанда иммуногенділігі жоғарырақ болды және антиденелер оның құрамына енетін ақуыздармен жақсырақ байланысқа түсе алды. Шамасы, рСМА+31 және рСМА25+31 құрамындағы пептидтер жасуша қабырғасының табиғи ақуыздарының құрылымында ғана иммуногенді болып келетініне ұқсайды. Бұл нәтижелер диагностикалық препараттар мен суббірліктік вакциналарды жасау мақсатында жақсы үміткер бола алатын мультиэпитопты ақуызды құрастыру мүмкіндігін көрсетеді. Айталық, *Brucella*-тұқымдасының триггер факторынан, рСМА31, рВР26 және төрт рСМА-ынан құрастырылған құрама (рСМА16, рСМА2b, рСМА31 және ВР26) ақуыздың қорғаныс әлеуеті тышқанның моделінде дәлелденген болатын [216, 20].

Мультипротеиндер жалқы ақуыздарға қарағанда, сиыр малының сарысу үлгілерінде бруцеллаларға қарсы антиденелерді анықтау кезінде ж-ИФТ-ың жоғары сезімталдығын, телімділігі мен дәлдігін қамтамасыз етті. Серопозитивті малды тексеру кезінде бұл сыналымның телімділігі РБС-ға қарағанда сәл төменірек болды. Бұл жерде РБС-да пайдаланылатын бруцелланың тұтас жасушаларының S-ЛПС-тері малдың қан сарысуындағы гетерогенді

антиденелермен де әрекеттесіп, сыналымның жалған оң нәтиже беруіне әкелетіндігін естен шығармаған абзал.

Бруцеллез диагностикасын жетілдіру саласындағы әлемдік әдебиеттерге талдау жасау соңғы жылдары жалқы ауру қоздырғышының рСМА-ы құрама және мультиэпитоптық ақуыздармен алмастырыла бастағанын көрсетеді [18, 19, 20]. Бруцелланың артықшылығы интегралды антигені ретінде соңғы ақуыздардың дайындалу технологиясында және серодиагностикада құрама ақуыздардан біршама болуында. рСМА16, рСМА31, рСМА2b және ВР26 эпитоптарынан жасалған мультиэпитоптық ақуыз тышқандардың бруцеллаға қарсы антиденелерін анықтау үшін антиген ретінде пайдаланылған болатын [20]. Зерттеу нәтижелері антигеннің сезімталдығы төменірек болғанымен, оның тұтас жасушалық антигенге қарағанда телімділігінің жоғары екендігін көрсетті. Сиыр және ешкі бруцеллезінің серодиагностикасында бұл құрама ақуызды ИФТ-дың қағаз нұсқасында қолдану үміт күттіретін нәтижелер берген [21]. Басқа бір зерттеу жұмысында адам бруцеллезінің серодиагностикасында рСМА22, рСМА25 және рСМА31-дің гибридіт имунодоминантты эпитоптары сыналды. Бұл ақуыз вестерн-блоттинг және ИФТ-ында ауру және сау адамдардың қанын бруцеллезге тексеру кезінде жақсы сезімталдық пен телімділік көрсеткен [16].

Біздің зерттеулерімізде сиыр және қой бруцеллезінің серологиялық балауындар СМА19+25, рСМА19+31 және рСМА25+31 негізіндегі ИФТ нұсқаларының салыстырмалы тиімділігі зерттелді. ж-ИФТ/рСМА19+31 және ж-ИФТ/19+25 сиыр және қой сарысуларын бруцеллезге тексеру кезінде РБС, КБР және коммерциялық ИФТ-жиынтықтың телімділіктерімен пара-пар телімділік танытты. Бірінші ақуыз сиыр малын серологиялық зерттеу кезінде ж-ИФТ-ға жоғарырақ сезімталдықты қамтамасыз етті. Алайда, қой сарысуларын зерттеу кезінде ж-ИФТ/рСМА19+31 сезімталдығы айтарлықтай төмен болды (42-44%). Бруцеллаға қарсы қой антиденелері рСМА19+25 (72-ақуызын қолданған кезде жақсырақ анықталды (76%).

Химерлі ақуыздар негізіндегі ИФТ валидациясы бруцеллез індетінің жаңа ошақтарынан алынған сиыр және қой қан сарысуларының үлгілерінде жүргізілді. Біз өз зерттеулерімізде «прозона» феноменін және бұғаттайтын немесе агглютинацияға қабілетсіз антиденелердің салдарынан жалған теріс нәтижелерді болдырмау үшін РБС-ның модификацияланған нұсқасын қолдандық. Ғылыми әдебиет көздеріне сүйенсек, сұйылтылған сарысуларды зерттеу *IgM*, *IgG* және *IgA* антиденелерін анықтау арқылы РБС телімділігін едәуір арттырады [203, 204].

РБС және КБР ҚР-да мал бруцеллезін балаудың бірінші (бастапқы) кезеңінде қолданылады. Бастапқы диагностикалық зерттеулер кезінде бір қан сарысу үлгісі екі кезеңде зерттеледі. Бірінші кезеңде диагностикалық зерттеу РБС, КБР–мен жүргізіледі. КБР малдың барлық түрлері үшін қан сарысуының 1:5 сұйылтынымында қойылады. Егер диагностикалық зерттеудің бірінші кезеңінің қорытындысы бойынша РБС және КБР нәтижелері теріс болса, онда мал сау деп танылады және бастапқы диагностикалық зерттеулердің екінші

кезеңін жүргізу талап етілмейді. Егер бірінші кезеңнің нәтижелері аталмыш дәстүрлі реакциялардың біреуі бойынша оң және/немесе күмәнді болса немесе екі сыналым бойынша да күмәнді және/немесе оң болса, онда міндетті түрде зерттеудің екінші кезеңі жүргізіледі.

Бруцеллез ошағындағы РБС бойынша оң нәтижелі сиырларда *Brucella*-ға тән антиденелер ж-ИФТ/рСМА19+31 әдісімен 52 (80%) баста анықталды. Көңіл аударатын жағдай - иммундықталдаудың сезімталдығы РБС-ында антидене титрлерінің ұлғаюына қарай жоғырылай түсті. Мысалы, егер 1:2, 1:4 және 1:8 сұйылтынымдарындағы РБС-оң қан сарысуларын зерттеу кезінде ж-ИФТ/рСМА19+31 сезімталдығы тиісінше 33%, 36% және 64% болса, ал үлгілердің 1:16 және 1:32 сұйылтынымдарын қолдану ИФТ сезімталдығын 100%-ға дейін көтерді. Бұл заңдылық басқа екі ақуыз негізіндегі ж-ИФТ нәтижелері бойынша, сондай-ақ бруцеллезге шалдыққан отардағы қойларды тексеру кезінде де байқалды. Бұл факт қан сарысуларының бастапқы сұйылтынымдарында РБС-ының тұтас жасуша антигенінің бруцеллаларға ұқсас бактерияларға бағытталған антиденелермен айқыш-реакцияларға түсе алу мүмкіндігін және/немесе полителимді IgM-антиденелердің белсенділігіне орай жалған оң нәтижелер көрсетуін жоққа шығармайды. Бұл жағдай, әрине, салыстырмалы зерттеулерде ж-ИФТ сезімталдығының төмендеуіне әкелетіні сөзсіз. Қой малын зерттеу кезінде рСМА19+31 және рСМА19+25 иммундық талдауға 81-84% аралығында дәлділік берді, ал алғашқы ақуыз талдауға жеткілікті телімділікті де қамтамасыз етті (70%). ж-ИФТ/рСМА25+31 нұсқасының сиыр (70%) және қой малын (40%) тексеру кезінде төмен телімділік көрсеткенін атап өту қажет. Бұл жерде РБС-теріс сарысуларда бруцеллаға қарсы антиденелердің анықталуы ж-ИФТ телімділігін төмендетуге әкелетіндігін де естен шығармау абзал. Одан қалды, РБС-ында СМА-дарына қарағанда бруцеллаға телімділігі төмен тұтас жасуша антигенін (S-ЛПС) қолдану жалған оң нәтижелерді орын алуына жол береді. Дегенмен, сыналған ақуыздардың ішінде рСМА19+31 ақуызын – күйіс қайырушы малдарды бруцеллезге серологиялық зерттеу үшін болашағы зор антиген ретінде қарастыруға болады.

Заманауи әдебиеттерді шолу, *Brucella*-ның рСМА жаңа буын вакциналарын жасауға ықтимал үміткерлер ретінде қарастырылуда, дегенмен әлі де болса тек бірнеше жұмыстарда ғана рСМА19 мен рСМА31-дің диагностикалық құндылығы зерттелген. Мысалы, рСМА19-ға қарсы жоғары титрлі қоян антиденелері алынып, иммунофлуоресцентті сыналымда *B. abortus*-ті анықтауда сәтті қолданылған [217]. Басқа зерттеушілер ж-ИФТ/рСМА31 және РБС диагностикалық сипаттамаларын салыстыру кезінде алғашқы сыналымның екіншісіне қарағанда телімдірек екендігін байқаған, дегенмен РБС-ның қой мен ешкілерді бруцеллезге тексеру кезінде сезімталдықтары жоғарырақ болған [211]. Келесі бір зерттеушілердің еңбектерінде рСМА31-дің сиыр бруцеллезін балауда өзінің тиімділігі жоғары антиген ретінде көрсеткені жазылған. Авторлар бұл ақуыз ИФТ-скринингінде үлгілердің көп мөлшерін тексеру үшін жарамды антиген деген қорытындыға

келген [219]. Біздің деректеріміз де рСМА19 және рСМА31-дің серологиялық әлеуетін растап отыр, алайда бұл екі ақуыздың диагностикалық құндылығы олардан құрама, яғни біртұтас антиген құрастырғанда біршама арта түсетіндігін дәлелдеді. Химерлі рСМА-ға негізделген ж-ИФТ нұсқалары сиыр мен қойқан сарысуларын бруцеллезге зерттеу кезінде әртүрлі сезімталдық пен телімділік көрсетті. Қол жеткізген нәтижелер қолданылған ақуыздар арасында ж-ИФТ үшін ең тиімді антиген рСМА19+31 екендігін анықтап, оны бруцеллезге шалдыққан малды дер кезінде және дәл анықтау мақсатында қолдануға болатындығын дәлелдеп отыр.

ҚОРЫТЫНДЫ

1. Бруцеллез індеті бойынша елімізде қалыптасқан күрделі эпизоотиялық-эпидемиялық жағдайда ауруға шалдыққан сиыр мен қой малын вакцинация алдында дәлірек анықтау мақсатында *Brucella* тұқымының бактерияларына тән рекомбинантты ақуыздарға негізделген ИФТ-ын қолданудың болашағы зор.

2. *Brucella*-ның қолданылған жалқы ақуыздарының арасында рСМА19-дың антигенділігі басқаларымен салыстырғанда біршама жоғары болды. Айталық, рСМА19-ға қарсы антиденелер *B. abortus* 544-пен жұқтырылған барлық сиырларда тәжірибенің 14-ші күні жоғары тирлерінде анықталса, ж-ИФТ/рСМА25 нұсқасында оң нәтиже 28-ші күні ғана байқалды, ал бұл мерзімдерде жануарлардың 25%-ында рСМА31-ге қарсы антиденелер мүлдем анықталынбады.

3. Бруцеллалардың минорлы рСМА19 ақуызы Фрейнд адьювантының көмегінсіз-ақ тышқанның телімді антиденелерін түзілуін құрсақ арқылы бір рет енгізгеннің өзінде тудыра алатын иммуногенді антиген.

4. *Brucella*-ның рСМА-дарына қарсы антиденелерді тек ауруға шалдыққан малдар ғана емес, сонымен қатар жұқпаға қарсы екпе алғандар да түзей алды. Мысалы, рСМА19, рСМА25 және рСМА31-ге қарсы антиденелер *B. abortus* 19 штаммымен қайтара егілген сау малдың жартысынан көбінің (61-64%) қан сарысуларында ревакцинациядан кейінгі 10 ай аралығында анықталды (бақылау уақыты).

5. Бруцелла бактерияларының рСМА19, рСМА25 және рСМА31-інің иммунодоминантты бөлімдері анықталып, жұптастырылған рСМА19+25, рСМА19+31 және рСМА25+31 ақуыздардың гендік-инженерлік конструкцияларының дизайны дайындалды және химерлік құрылымдардың мультиэпитоптарының синтезіне жауапты гендердің нуклеотидтік тізбегі *in silico* жағдайында жасалынды; рЕТ-28 плазмидасының құрамына гендер клондалынып, *E. coli* BL21 (DE3) жасушаларында ақуыздардың экспрессиясына қол жеткізілді және мақсатты өнімді индукциялаудың оңтайлы параметрлері анықталды.

6. Мультиэпитопты рСМА19+25 және рСМА19+31 ақуыздар ТФА, сонан соң БФЕ суспензиясымен егілгеннен кейін 28-ші күні тышқан қан сарысуларында антиденелердің титрлерін ж-ИФТ-інде тиісінше 1:3940 (+32.0%; -24.2%) және 1:1840-ге (+52.6%; -34.4%) дейін жеткізіп, өздерінің иммуногенділік қасиеттерін көрсетті. Дегенмен, рСМА19+31 *Brucella*-ға телімді антиденелерге қатысты анағұрлым айқын антигенділігін көрсетіп, қоянның анти-*B. abortus* 19 сарысуымен 1:12800 титріне дейін әрекеттесе алды.

7. Бруцелланың мультиэпитопты ақуыздары экспрессия, тазарту және электрофорез кезінде өздерінің табиғи аналогтарына сай аутенттілігін (түпнұсқалығын) сақтап, *B. abortus* 544 вирулентті штаммымен тәжірибелі түрде жұқтырылған құнажынның қан сарысуындағы антиденелермен әрекеттесе алды.

8. ж-ИФТ/рСМА19+31 және ж-ИФТ/рСМАМ19+25 сынамаларының телімділігін сиырларды бруцеллезге серологиялық зерттеулер кезінде алынған

РБС нәтижелері толығымен растады (100%), алайда иммуноталдаудың екінші нұсқасы сезімталдығы бойынша біріншісімен салыстырғанда айтарлықтай төмен болды (тиісінше, 34% және 80%). рСМА19+25 антигенін ж-ИФТ-да қолдану оның дәлдігінің айтарлықтай төмендеуіне әкелді (43%).

9. Қойларды бруцеллезге серологиялық зерттеу кезінде рСМА19+31, басқа екі құрама ақуыздармен салыстырғанда, ж-ИФТ-ге жоғары телімділік бере алды (70%), алайда сыналымның осы нұсқасының сезімталдығы (86%) ИФТ/рСМА19+25 қарағанда (96%) төменірек болды. Дегенмен, рСМА 25+31 қой қан сарысуларын бруцеллезге тексеру кезінде телімділігі бойынша (40%) рСМА19+31-ден біршама төмен болды.

10. Қан сарысулары сұйылтынымдарының өсуіне қарай мультипротеинді рекомбинантты антигендер негізіндегі ж-ИФТ-нің сезімталдығы РБС-мен салыстырғанда жоғарылай түседі. Айталық, егер РБС-ында қан сарысуы сұйылтымының 1:2 дәрежесінде оң нәтиже берген сиырларды тексеру кезінде ж-ИФТ/рСМА19+25, ж-ИФТ/рСМА19+31 және ж-ИФТ/рСМА25+31-дің сезімталдығы 0%, 33% және 67%-ды құраса, ал үлгілерді 1:32 сұйылтымына дейін зерттеген жағдайда бұл көрсеткіштер тиісінше 66%, 100% және 97%-ға дейін көтерілді. Бұл заңдылық қой қан сарысуларын бруцеллезге тексеру кезінде де байқалып, зерттеу үлгілерінің бастапқы сұйылтынымдарында РБС-ының жалған оң нәтижелер көрсету мүмкіндігін анықтады.

11. Мультиэпитопты ақуыздардың ішінде рСМА19+31-ге негізделген ж-ИФТ мал бруцеллезінің серологиялық диагностикасында қолданыс таба алатын ең қолайлы антиген болып отыр. ж-ИФТ/рСМА19+31 сыналымының коммерциялық ИФТ-жиынтығына (INgezim Brucella Compaq 2.0, Spain) қатысты дәлдігі сиырлар мен қойларды бруцеллезге зерттеу кезінде тиісінше 92% және 79%-ға тең болды. Өзірленген ИФТ-сыналымы сиыр бруцеллезін балауда *Brucella LTFLOW* (LT Biotech, Литва) ИХТ-імен салыстырғанда дәлірек нәтиже алуға мүмкіндік береді.

Практикалық ұсыныстар

1. «Республикалық микроорганизмдер коллекциясы» республикалық мемлекеттік қазыналық кәсіпорынының депозитіне алынған *Brucella* spp. сыртқы мембранасының рекомбинантты ақуызын өндіруші *E. coli* BL21(DE3)/рЕТ28а/рСМА19+31 штаммы (тіркеу нөмірі В-РКМ 00913) ауру қоздырғышына тән диагностикалық құндылығы жоғары антигенді алу мақсатында қолдануға ұсынылып отыр.

2. ҚазАТУ Басқарма төрағасының ғылыми және инновациялық жұмыстар жөніндегі орынбасары бекіткен «Бруцеллезді диагностикалауға арналған ИФТ-жиынтығын дайындау мен пайдаланудың зертханалық регламенті» дайындалды (23.09.2022 жылғы №9 хаттама).

3. Зерттеу нәтижелері ҚазАТУ-нің М082 – «Биотехнология» және М138 – «Ветеринария» оқу бағдарламалары бойынша магистранттар мен докторанттардың оқу үрдісінде қолданыс тапты.

ҚОЛДАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Cardoso P.G., Macedo G.C., Azevedo V., Oliveira S.C. Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system // *Microb Cell Fact.* – 2006. – Vol. 5, – P. 13.
2. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis, N., Christou L., Tsianos E.V., The new global map of human brucellosis // *Lancet Infect.* – 2006. – Vol. 6, – P. 91-99.
3. Научное обеспечение ветеринарного благополучия и пищевой безопасности: Отчет о НИР (заключительный) / Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт: руководитель программы Султанов А.А.; исполнитель Тургенбаев К.А. Алматы, – 2020. – С. 431 – № Госрегистрации: 0118РК01221. – Инв. № 0218РК01084.
4. Ешмухаметов А.Е., Бейсембаев К.К., Асауова З.С. и Султанова А.О. Мониторинг и анализ эпизоотической ситуации по бруцеллезу крупного рогатого скота в Республике Казахстан за 2007-2015 годы // *Вестник Костанайского государственного университета им. А. Байтурсынова.* – 2016. – № 2. – С. 36-41.
5. Roushdy, C.M., Moustafa A-MM, Abdelwahab, M.G., Ibrahim, F.K. and El-bauomy, E.M. Latex Agglutination: A Rapid, specific immunoassay for diagnosis of ruminant brucellosis // *Adv. Anim. Vet. Sci.* – 2021. – Vol. 9, №9. – P. 1292-1301.
6. Kumar, A., Suryawanshi, S.N. and Thavaselvam, D., Evaluation of diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Romp28) of Brucella melitensis for serodiagnosis of ovine and caprine brucellosis // *Defence Life Sci.* – 2019. – Vol. 4, №4. – P. 244-249.
7. Vatankhah, M., Beheshti, N., Mirkalantari, S., Khoramabadi, N., Aghababa, H. and Mahdavi, M. Recombinant Omp2b antigen-based ELISA is an efficient tool for specific serodiagnosis of animal brucellosis // *Braz. J. Microbiol.* – 2019. – Vol. 50, №4. – P. 979-984.
8. Nagalingam, M., Basheer, T.J., Balamurugan, V., Shome, R., Kumari, S.S., Reddy, G.B.M., Shome, B.R., Rahman, H., Roy, P., Kingston, J.J. and Gandham, R.K. Comparative evaluation of the immunodominant proteins of Brucella abortus for the diagnosis of cattle brucellosis // *Vet. World.* – 2021. – Vol. 14, №3. – P. 803-812.
9. Tian, M., Song, M., Yin, Y., Lian, Z., Li, Z., Hu, H., Guan, X., Cai, Y., Ding C, Wang, S., Li, T., Qi, J. and Yu, S. Characterization of the main immunogenic proteins in Brucella infection for their application in diagnosis of brucellosis // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect.* – 2020. Dis., – Vol.4, 101462.
10. Faria, A.R., Dorneles, E.M.S., Pires, S.D.F., Andrade, H.M.D. and Lage, A.P. Immunoproteomics of Brucella abortus reveals potential of recombinant antigens for discriminating vaccinated from naturally infected cattle // *Microb. Pathog.* – 2020. – Vol. 147, 104345.
11. Khodabakhsh, T., Arabi, A., Pakzad, P., Gheflat, S., Bahreinipour, A. and Bandehpour, M. A new ELISA kit based on antigenic epitopes for diagnosing Brucella abortus // *Microbiol. Biotechnol. Lett.* – 2019. – Vol. 47, №1. – P.158-163.

12. Bai, Q., Li, H., Wu, H., Shao, J., Sun, M. and Yin, D. Comparative analysis of the main outer membrane proteins of *Brucella* in the diagnosis of brucellosis // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2021 – Vol. 30, №560. – P. 126-131.
13. Hou, H., Liu, X. and Peng, Q. The advances in brucellosis vaccines // *Vaccine*, – 2019 – Vol. 9, №30. – P. 3981–3988.
14. Verdiguél-Fernández, L., Oropeza-Navarro, R., Ortiz, A., Robles-Pesina, M.G., Ramírez-Lezama, J., Castañeda-Ramírez, A. and Verdugo-Rodríguez, A. *Brucella melitensis* Omp31 mutant is attenuated and confers protection against virulent *Brucella melitensis* challenge in Balb/c mice. // *J. Microbiol. Biotechnol.*, – 2020. – Vol 30, №4. – P. 497–504.
15. Gupta, S., Singh, D., Gupta, M. and Bhatnagar, R. A combined subunit vaccine comprising BP26, Omp25 and L7/L12 against brucellosis // *Pathog. Dis.* – 2019. – Vol 77, №8. ftaa002.
16. Rezaei, M., Rabbani-Khorasgani, M., Zarkesh-Esfahani, S.H., Emamzadeh, R. and Abtahi, H. Prediction of the Omp16 epitopes for the development of an epitope-based vaccine against Brucellosis // *Infect. Disord. Drug Targets.* – 2018. – Vol.18, – P. 36-45.
17. Ryskeldinova, S., Zinina, N., Kydyrbayev, Z., Yespembetov, B., Kozhamkulov, Y., Inkarbekov, D., Assanzhanova, N., Mailybayeva, A., Bugybayeva, D., Sarmyкова, M., Khairullin, B., Tabynov, K., Bulashev, A., Aitzhanov, B., Abeuov, K., Sansyzybay, A., Yespolov, T., Renukaradhya, G.J., Olsen, S., Oñate, A. and Tabynov, K. Registered influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine for cattle in Kazakhstan: Age-wise safety and efficacy studies // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2021. – Vol.11, 669196.
18. Simborio, H.L.T., Lee, J.J., Reyes, A.W.B., Hop, H.T., Arayan, L.T., Min, W., Lee, H.J., Yoo, H.S. and Kim, S. Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis // *Microb. Pathog.* – 2015 – Vol.83, №84. – P. 41-46;
19. Ahmed, I., Khairani-Bejo, S., Hassan, L., Bahaman, A. and Omar, A. 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, 275.
20. Yin, D., Bai, Q., Li, L., Xu, K. and Zhang, J. Study on immunogenicity and antigenicity of a novel *Brucella* multiepitope recombined protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 540. – 2021. – P. 37-41.
21. Yin, D, Bai, Q., Wu, X., Li, H., Shao, J., Sun, M. and Zhang, J. A multi-epitope fusion protein-based p-ELISA method for diagnosing bovine and goat brucellosis // *Front. Vet. Sci.* – 2021. – Vol.8, 708008.
22. Dehghani, S., Sabzehei, F., Taromchi, A.M., Mobaien, A.R. and Arsang-Jang, S. Hybrid recombinant Omp 22, 25, and 31 immunodominant epitopes can be used for serodiagnosis of brucellosis // *J. Immunol. Methods.* – 2021. – Vol. 497, – P.113-123.

23. Poester P.P., Nielsen K., Samartino L.E. and Yu W. L. Diagnosis of Brucellosis. // The Open Veterinary Science Journal. – 2010. – Vol.4. – P. 46-60.
24. Corbel M.J. Brucellosis: An Overview Proceedings of the 1st International Conference on Emerging Zoonoses // Emerging Infectious Diseases. – 1997. – P. 213-221.
25. Office International des Épizooties, “Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines // Office International des Épizooties, Paris. – 2000.
26. Godfroid J., Nielsen K. and Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife // Croatian Medical Journal. – 2010. – Vol. 51, №4. – P.296-305.
27. Bergey D.H., Holt J.G. Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology // 9. Williams & Wilkins; Baltimore, MD, USA. Provides a brief synopsis of the genus and related genera for comparison. – 1994.
28. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts // Proc Natl Acad Sci USA. – 2002. – Vol. 99, №20. – P. 13148-13153.
29. Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, et al. Isolation of *Brucella microti* from soil // Emerg Infect Dis. – 2008. – Vol. 14, №8. – P.1316-1317.
30. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, et al. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis* // J Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, №8. – P. 2715–2726.
31. Chain PSG, Comerci DJ, Tolmasky ME, et al. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae* // Infect Immun. – 2005. Vol. 73, №12– P.8353–8361.
32. A comparison of *Brucella* genomes reveals species-specific variation. 8. Wattam AR, Williams KP, Snyder EE, et al. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle // J Bacteriol. – 2009. – Vol. 191, №11. – P.3569-3579.
33. Tsolis RM, Seshadri R, Santos RL, et al. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, №5. – e5519.
34. Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella* // J Bacteriol. – 2009; Vol. 191, №8. – P. 2864–2870.
35. [Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution / T. Ficht // Future Microbiol. - 2010.– Vol. 5, – P. 859-866.
36. Comparative Phylogenomics and Evolution of the Brucellae Reveal a Path to Virulence / A.R. Wattam (et al.) // Journal of Bacteriology. – 2014. – Vol. 196, №5. – P. 920-930.
37. Pan-Genome of *Brucella* Species. / J. Sankarasubramanian (et al.) // Indian J. Microbiol. – 2015. – Vol. 55, №1. – P. 88-101
38. Thomas Ficht Erratum: *Brucella* taxonomy and evolution // Future Microbiol. – 2010. – Vol. 5, №6. – P. 859-66.

39. Ewalt DR, Payeur JB, Rhyan JC, Geer PL. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological, and histological study // J Vet Diagn Invest. – 1997. – Vol. 9, №4. – P. 417–420.
40. Cheville NF, Rogers DG, Deyoe WL, Krafsur ES, Cheville JC. Uptake and excretion of *Brucella abortus* in tissues of the face fly (*Musca autumnalis*) // Am J Vet Res. – 1989. – Vol. 50, №8. – P. 1302-1306.
41. Audic S, Lescot M, Claverie JM, Scholz HC. *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen // BMC Genomics. – 2009. – Vol.10, №352.
42. Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, et al. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain s19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, №5. – e2193.
43. Michaux S, Paillisson J, Carlesnurit MJ, Bourg G, Allardetservent A, Ramuz M. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16m genome // J Bacteriol. – 1993. – Vol.175, №3. – P.701-705
44. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, Ramuz M, Allardet-Servent A. Unconventional genomic organization in the α subgroup of the proteobacteria // J Bacteriol. – 1998. – Vol.180, №10. – P.2749-2755.
45. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol. Summarizes in careful detail the methods currently being used to characterize significant differences that may be used for more rapid species identification // – 2009. – Vol. 9, №6. – P. 1168-1184
46. Bruce D. Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever // Practitioner. – 1887. – P. 16-39.
47. Wyatt HV. How Themistocles Zammit found Malta fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. J R Soc Med. – 2005. – Vol. 98, №10 – P. 451–454.
48. Bang B. Infectious abortion in cattle // J Comp Pathol. – 1906. – Vol. 19, – P. 191-202.
49. Huddleson F, Hallman ET. The pathogenicity of the species of the genus *Brucella* for monkeys // J Infect Dis. – 1929. – Vol. 9845, – P. 293–303.
50. Carmichael LE, Bruner DW. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions // Cornell Vet. – 1968. Vol 58, – P. 579–592.
51. Buddle MB. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia // J Hyg (Lond). – 1956. – Vol. 54, №3. – P. 351–364
52. Stoenner HG, Lackman DB. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotomalepida Thomas* // Am J Vet Res. – 1957. Vol.18, – P. 947–951.
53. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the Brucellosis Laboratory // Insitute National de la Recherche Agronomique; Paris, France: – 1988.

54. Banai M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations // *Vet Microbiol.* – 2002. – Vol. 90, №1-4. – P. 497-519.
55. Hoyer BH, McCullough NB. Homologies of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, canine abortion organisms, and other *Brucella* species // *J Bacteriol.* – 1968. – Vol. 96, – P. 1783–1790.
56. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Crayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization // *Int J System Bacteriol.* – 1985. – P. 292-295.
57. Gargani G, Lopez-Merino A. International committee on systematic bacteriology; subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: correspondence report (interim report), 1991–1993 // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2006. – Vol. 56, №5. – P. 1167-1168.
58. Osterman B, Moriyon I. International committee on systematics of prokaryotes; subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2006. – Vol. 56, №5.– P. 1173-1175.
59. Le Fleche P, Jacques I, Grayon M, et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay // *BMC Microbiol.* – 2006. – Vol. 6, №9.
60. Miller WG, Adams LG, Ficht TA, et al. *Brucella*-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) // *J Zoo Wildl Med.* – 1999. – Vol. 30, №1. – P. 100-110.
61. Garner MM, Lambourn DM, Jeffries SJ, et al. Evidence of *Brucella* infection in parafilaroides lungworms in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) // *J Vet Diagn Invest.* // – 1997. – Vol. 9, – P. 298-303.
62. Groussaud P, Shankster SJ, Koylass MS, Whatmore AM. Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences // *J Med Microbiol.* – 2007. – Vol. 56, №11. – P. 1512-1518.
63. Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, et al. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in Lower Austria // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2009. – Vol. 9, №2. – P.153–156.
64. De BK, Stauffer L, Koylass MS, et al. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection // *J Clin Microbiol.* – 2008. – Vol. 46, №1. – P. 43–49.
65. Бруцеллёз. Современное состояние проблемы / под ред. Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко. – Ставрополь: ООО «Губерния», – 2019. – 336 с.
66. Joint FAO/ WHO Expert Committee on Brucellosis // – Geneva. – 1986. – P.132.
67. Smith J. A. *Brucella* Lipopolysaccharide and pathogenicity: The core of the matter. / J. A. Smith // *J. Virulence.* – 2018. – Vol. 9, – №1. – P. 379-382.
68. Драновская Е.А. Таксономия возбудителя бруцеллеза / Е.А. Драновская Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации

мед.помощи больным // тез. докл. Всесоюзн. конф., Новосибирск, 24-25 октября – 1989 г. – Москва, – 1989.–. 54 с.

69. P.G. Cardoso, G.C. Macedo, V. Azevedo, S.C. Oliveira. Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system // Microb Cell Fact. – 2006. – №5. – P.13.

70. A. Marx, J. Ionescu, A. Pop. Immunochemical studies on Brucella abortus lipopolysaccharides // Zbl. Bacteriol. – 1983. – Vol. 253, №4. – P. 544-553.

71. X.M. Li, Y.X Kang, L. Lin et al. Genomic Characterization Provides New Insights for Detailed Phage- Resistant Mechanism for Brucella abortus / // Front Microbiol. – 2019. – Vol. 10, – P. 917.

72. J. Kubler-Kielb, E. Vinogradov. Reinvestigation of the structure of Brucella O-antigens // Carbohydr. Res. – 2013. – №378. – P. 144-147.

73. J. Meikle Peter, B. Perry Malcolm, J.W. Cherwonogrodzky, Bundle D.R. Fine structure of A and M antigens from Brucella biovars // Infec. and Immun. – 1989. – Vol. 57, №9. – P. 2820-2828.

74. G. Dubray, J. Limet. Evidence of heterogeneity of lipopolysaccharides among Brucella biovars in relation to A and M specificities // Ann. Inst. Pasteur. Microbiol. – 1987. – Vol. 138, №1. – P. 27-37

75. Al Dahouk, S.; Nöckler, K.; Scholz, H.C.; Tomaso, H.; Bogumil, R.; Neubauer, H. Immunoproteomic characterization of Brucella abortus 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of Brucella infections // J. Immunol. Methods – 2006. – Vol. 309, – P. 34-47.

76. Connolly, J.P.; Comerchi, D.; Alefantis, T.G.; Walz, A.; Quan, M.; Chafin, R.; Grewal, P.; Mujer, C.V.; Ugalde, R.A.; DelVecchio, V.G. Proteomic analysis of Brucella abortus cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development // Proteomics – 2006. – Vol. 6, – P. 3767–3780

77. Zhao, Z.P.; Yan, F.; Ji, W.H.; Luo, D.Y.; Liu, X.; Xing, L.; Duan, Y.Q.; Yang, P.H.; Shi, X.M.; Li, Z.; et al. Identification of immunoreactive proteins of Brucella melitensis by immunoproteomics // Sci. China Life Sci. – 2011. – Vol. 54, – P. 880-887.

78. Yang, Y.; Wang, L.; Yin, J.; Wang, X.; Cheng, S.; Lang, X.; Wang, X.; Qu, H.; Sun, C.; Wang, J.; et al. Immunoproteomic analysis of Brucella melitensis and identification of a new immunogenic candidate protein for the development of brucellosis subunit vaccine // Mol. Immunol. – 2011. – Vol. 49, – P. 175-184.

79. Pajuaba, A.C.A.M.; Silva, D.A.O.; Almeida, K.C.; Cunha-Junior, J.P.; Pirovani, C.P.; Camillo, L.R.; Mineo, J.R. Immunoproteomics of Brucella abortus reveals differential antibody profiles between S19-vaccinated and naturally infected cattle // Proteomics. – 2012. – Vol. 12, – P. 820-831.

80. Lee, J.J.; Simborio, H.L.; Reyes, A.W.B.; Kim, D.G.; Hop, H.T.; Min, W.; Her, M.; Jung, S.C.; Yoo, H.S.; Kim, S. Proteomic analyses of the time course responses of mice infected with Brucella abortus 544 reveal immunogenic antigens // FEMS Microbiol. Lett. – 2014. – Vol. 357, – P. 164-174

81. Kim, J.Y.; Sung, S.R.; Lee, K.; Lee, H.K.; Kang, S., II; Lee, J.J.; Jung, S.C.; Park, Y.H.; Her, M. Immunoproteomics of Brucella abortus RB51 as candidate

antigens in serological diagnosis of brucellosis // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2014. – Vol. 160, – P. 218-224.

82. Wareth, G.; Eravci, M.; Weise, C.; Roesler, U.; Melzer, F.; Sprague, L.D.; Neubauer, H.; Murugaiyan, J. Comprehensive identification of immunodominant proteins of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* using antibodies in the sera from naturally infected hosts // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol.17, – P. 695.

83. Poetsch A. and Marchesini M. Proteomics of *Brucella* // *Proteomes* – 2020. – Vol.8, – № 2.

84. Jan, A.T. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: A perspective update // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8, – P. 1–11.

85. Boigegrain, R.; Salhi, I.; Machold, J.; Fedon, Y.; Arpagaus, M.; Weise, C.; Rittig, M.; Rouot, B. Release of Periplasmic Proteins of *Brucella suis* upon Acidic Shock Involves the Outer Membrane Protein Omp // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72, – P. 5693–5703.

86. Pollak, C.N.; Delpino, M.V.; Fossati, C.A.; Baldi, P.C. Outer Membrane Vesicles from *Brucella abortus* Promote Bacterial Internalization by Human Monocytes and Modulate Their Innate Immune Response // *PLoS ONE* – 2012. – Vol. 7, – №11.

87. Avila-Caldern, E.D.; Lopez-Merino, A.; Jain, N.; Peralta, H.; Lpez-Villegas, E.O.; Sriranganathan, N.; Boyle, S.M.; Witonsky, S.; Contreras-Rodríguez, A. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice // *Clin. Dev. Immunol.* – 2012.

88. Wang, Y.; Chen, Z.; Qiao, F.; Ying, T.; Yuan, J.; Zhong, Z.; Zhou, L.; Du, X.; Wang, Z.; Zhao, J.; et al. Comparative proteomics analyses reveal the virB of *B. melitensis* affects expression of intracellular survival related proteins // *PLoS ONE* – 2009. – Vol. 4, – e5368.

89. Delpino, M.V.; Comerci, D.J.; Wagner, M.A.; Eschenbrenner, M.; Mujer, C.V.; Ugalde, R.A.; Fossati, C.A.; Baldi, P.C.; DeVecchio, V.G. Differential composition of culture supernatants from wild-type *Brucella abortus* and its isogenic virB mutants // *Arch. Microbiol.* – 2009. – Vol. 191, – P. 571-581.

90. Wang, Y.; Chen, Z.; Qiao, F.; Zhong, Z.; Xu, J.; Wang, Z.; Du, X.; Qu, Q.; Yuan, J.; Jia, L.; et al. and the outer membrane properties of *Brucella melitensis* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2010. – Vol. 303, – P. 92-100.

91. Paredes-Cervantes, V.; Flores-Mejía, R.; Moreno-Lafont, M.C.; Lanz-Mendoza, H.; Tello-López, Á.T.; Castillo-Vera, J.; Pando-Robles, V.; Hurtado-Sil, G.; González-González, E.; Rodríguez-Cortés, O.; et al. Comparative proteome analysis of *Brucella abortus* 2308 and its virB type IV secretion system mutant reveals new T4SS-related candidate proteins // *J. Proteomics* – 2011 – Vol. 74, – P. 2959-2971.

92. Lee, J.J.; Lim, J.J.; Kim, D.G.D.H.H.; Simborio, H.L.; Kim, D.G.D.H.H.; Reyes, A.W.B.; Min, W.G.; Lee, H.J.; Kim, D.G.D.H.H.; Chang, H.H.; et al. Characterization of culture supernatant proteins from *Brucella abortus* and its protection effects against murine brucellosis // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 37, – P. 221-228.

93. Winter A.J. Outer membrane proteins of *Brucella* // *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* – 1987. – Vol. 138, №1. – P. 87-89.
94. Dubray G. B.G. Isolation of three *Brucella abortus* wall-cell antigens protective in murine experimental brucellosis // *Ann.Rech.Vet.* – 1980. – Vol. 11, – P. 367-373.
95. Dubray G. C.C. Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharides species in the *Brucella* outer membrane // *Ann.Rech.Vet.* – 1983. – Vol. 14, P. 311-318.
96. Verstrate D.R. W.A.J. Comparison sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains // *Inf.Imm.* – 1984. – Vol. 46, – P. 182-187.
97. Carmichael L.E., Joubert J.C. O.J. Isolation, Purification, and Partial Characterization of *Brucella abortus* Matrix Protein // *Infect Immun* – 1983. – Vol. 39, №1. – P. 394-402.
98. Santos J.M. et al. Outer Membrane Proteins from Rough Strains of Four *Brucella* Species // *Infect. Immun.* – 1984. – Vol. 46, №1. P.188-1945.
99. Douglas J.T., Rosenberg E.Y., Nikaido H., Verstrate D.R. W.A.J. Porins of *Brucella* species // *Infect. Immun.* – 1984. – Vol. 44, №1. P. 16-21.
100. Tabatabai L.B., Deyoe B.L. Biochemical and biological properties of soluble protein preparations from *Brucella abortus* // *Dev. Biol. Stand.* – 1984. – Vol. 56, – P. 199-211.
101. D.R. Verstrate A.J. Winter. Comparison of Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Profiles and Antigenic Relatedness Among Outer Membrane Proteins of 49 *Brucella abortus* Strains // *Infect. Immun.* – 1984. – Vol. 46, №1. – P. 182–187.
102. Carmichael L.E., Joubert J.C. J.L. Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs // *Vet Microbiol.* – 1989. – Vol. 19, №4. – P. 373-387.
103. Chin J.C. Comparison of different antigenic preparations for the detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis* by ELISA // *Aust. Vet. J.* – 1983. – Vol. 60, №9. – P. 261-264.
104. Hunter S B , Bibb W F, Shih C N, Kaufmann A F , Mitchell J R and M.R.M. Enzyme-linked immunosorbent assay with major outer membrane proteins of *Brucella melitensis* to measure immune response to *Brucella* species // *J. Clin. Microbiol.* – 1986. – Vol. 24, №4. – P. 566-572.
105. Araj G.F., Kaufmann A.F. Determination by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA to *Brucella Melitensis* Major Outer Membrane Proteins and Whole-Cell Heat-Killed Antigens in Sear of 32 Patients with Brucellosis // *J. Clin. Microbiol.* – 1989. – Vol. 27, – №8. – P. 1909-1912.
106. Afzal M. et al. Isolation and antigenic reactivity of *Brucella ovis* outer membrane proteins // *J. Clin. Microbiol.* – 1987. – Vol. 25, – №11. – P. 2132-2135.
107. Hoffmann E.M., Belzer, Tabatabai C.A., Deyoe L.B. B.L. Differentiation by western blotting of immune responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus*

strain 19 or infected experimentally or naturally with virulent *Brucella abortus* // *Am J Vet Res.* – 1991. – Vol. 27, – P. 79-90.

108. Hoffmann E.M., Shapiro S.J. Nicoletti P. Evaluation of serologic and cellular immune responses of cattle to a nonlipopolysaccharide antigen from *Brucella abortus* // *Am J Vet Res.* – 1990. – Vol. 51, – №2. – P. 216-221.

109. Kittelberger R. R.M. Evaluation of electrophoretic immunoblotting for *Brucella ovis* infection in deer using rum and deer serum // *N.Z. veter. J.* – 1998. – Vol. 46, – №1. – P. 32-34.

110. Baldi P.C., Wanke M.M., Loza M.E., Monachesi N. F.C.A. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp. // *Vet Microbiol.* – 1997. – Vol. 57, – №2-3. – P. 273-281.

111. Bricker B.J. et al. Cloning, expression, and occurrence of the *Brucella* Cu-Zn superoxide dismutase // *Infect. Immun.* – 1990. – Vol. 58, – №9. – P. 2935–2939;

112. Oñate A. a et al. A DNA Vaccine Encoding Cu , Zn Superoxide Dismutase of *Brucella abortus* Induces Protective Immunity in BALB/c Mice // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71, – №9. – P. 4857-4861.

113. Cloeckaert A. et al. Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay // *Infect. Immun.* – 1990. – Vol. 58, – №12. – P. 3980-3987.

114. Tibor A. et al. Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus* // *Infect. Immun.* – 1996. – Vol. 64, № 1. – P. 100-107.

115. Tibor A., Decelle B., Letesson J.J. Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins // *Infect. Immun.* – 1999. – Vol. 67, – №9. – P. 4960-4962.

116. Wanke M.M., Delpino M.V. B.P.C. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis // *Vet. Microbiol.* – 2002. – Vol. 88, – №4. – P. 367-375.

117. Шенжанов К.Т., Сураншиев Ж.А., Булашев А.К О.С.Г. Патент №14230 Республика Казахстан, G01N 33/535. Способ определения антител против возбудителя бруцеллеза // заявл. 22.07.2002; опубл.15.04.2008. 4 с.

118. Poester P, Nielsen K, Samartino E Diagnosis of brucellosis // *Open Vet Sci J* – 2010. – Vol, – P. 46-60.

119. OIE Bovine brucellosis in terrestrial manual // – 2009.

120. Gall D, Nielsen K, Forbes L, Cook W, Leclair D, et al. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids // *J Wildlife Dis.* – 2001. – Vol. 37, №1. – P. 110-118.

121. Nielsen K, Gall D, Smith P, Balsevicius S, Garrido F, et al. Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis* // *Rev Sci Tech.* – 2004. – Vol. 23, – P. 979-987.

122. Perrett LL, McGiven JA, Brew SD, Stack JA Evaluation of competitive ELISA for detection of antibodies to Brucella infection in domestic animals // *Croat Med J.* – 2010. – Vol. 51, – P. 314-319.
123. Díaz R, Casanova A, Ariza J, Moriyón I The Rose Bengal Test in human brucellosis: a neglected test for the diagnosis of a neglected disease // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2011. – Vol. 5, – e950.
124. Christopher S, Umapathy BL, Ravikumar KL Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis // *J Lab Physicians.* – 2010. – Vol. 2, – P. 55-60.
125. Araj GF Update on laboratory diagnosis of human brucellosis // *Int J Antimicrob Agents* 36 Suppl. – 2010. – Vol. 1, – P. 12-17.
126. Sathyanarayan S, Suresh S, Krishna S, Mariraj J A comparative study of agglutination tests, blood culture and ELISA in the laboratory diagnosis of human brucellosis // *Int J Biol Med Res.* – 2011. – Vol. 2, – P. 569-572.
127. Mantur B, Parande A, Amarnath S, Patil G, Walvekar R, et al. ELISA versus conventional methods of diagnosing endemic brucellosis // *Am J Trop Med Hyg.* – 2010. – Vol. 83, – P. 314-318.
128. Gall D, Nielsen K, Vigliocco A, Smith P, Perez B, et al. Evaluation of an indirect-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *B. ovis* in sheep // *Small Rum Res.* – 2003. – Vol. 48 – P. 173-179.
129. Poiester FP, Nielsen K, Samartino LE, Yu WL Diagnosis of Brucellosis // *Open Vet. Sci. J.* – 2010. – Vol. 4, – P. 46-60.
130. Kaltungo BY, Saidu SNA, Sackey AKB, Kazeem HM (2013). Serological Evidence of Brucellosis in Goats in Kaduna North Senatorial District of Kaduna State, Nigeria // *ISRN Vet. Sci.* Article ID 963673. – 2013. – 6 p.
131. Nielsen K, Yu WL. Serological Diagnosis of Brucellosis // *Ottawa Laboratories (Fallow field), Canadian Food Inspection Agency, Nepean, Ontario, Canada.* – 2010. – Vol. 31, – P. 65-89.
132. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Silva Paulo P, Nielsen K Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis // *J Med Microbiol.* – 2003. – Vol. 52 – P. 883-887.
133. Nielsen K Diagnosis of brucellosis by serology // *Vet Microbiol.* – 2002. – Vol. 90, – P. 447-459.
134. Gall D, Nielsen K, Forbes L, Cook W, Leclair D, et al. Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids // *J Wildlife Dis.* – 2001. – Vol. 37, – P. 110-118.
135. Ebani VV, Cerri D, Fratini F, Bey RF, Andreani E Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucellacanis* // *New Microbiol.* – 2003. – Vol. 26, – P. 65-73.
136. Costa A, Sant'ana M, Carvalho S, Moustacas S, Silva S, et al. Diagnosis of *B. ovis* infection by serology and PCR in urine samples from naturally infected rams in the State of Piauí. *Arquivo Brasileiro de Medic // Vet Zootecnia.* – 2012. – Vol. 64, – P. 751-75.

137. Özdemir M. et al. A comparison of immunocapture agglutination and ELISA methods in serological diagnosis of brucellosis // *Int. J. Med. Sci.* – 2011. – Vol. 8, №5. – P. 428-432.
138. Christopher S., Umapathy B., Ravikumar K. Brucellosis: Review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis // *J. Lab. Physicians.* –2010. – Vol. 2, №2. P. 55-60.
139. Taleski V. An overview of introducing various laboratory tests for diagnosis of human brucellosis in the republic of Macedonia // *Maced. J. Med. Sci.* – 2010. – Vol. 3, – №3. – P. 239-245.
140. Abdoel T., Dias I., Cardoso R., Smits H. Simple and Rapid Field Tests for Brucellosis in Livestock // *Veterinary Microbiology, Elsevier.* – 2008. – Vol. 130, – №3-4. – PP. 312.
141. Saegerman C, Vo TK, De Waele L, Gilson D, Bastin A, et al. Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance // *Vet Rec.* – 1999. – Vol. 145, – P. 214-218.
142. Pouillot R, Garin-Bastuji B, Gerbier G, Coche Y, Cau C, et al. The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis // *Vet Res.* – 1997. – Vol. 28, – P. 365-374.
143. A Pragle, MS; C Blackmore, DVM; TA Clark, MD; MD Ari, PhD; PP Wilkins. Public Health Consequences of a False-Positive Laboratory Test Result for Brucella -- Florida, Georgia, and Michigan, 2005 // *Morbidity and Mortality Weekly Report.* – 2008. – Vol. 57, №22. – P. 603-605.
144. Gopaul K.K., Koylass M.S., Smith C.J., Whatmore A.M. Rapid identification of Brucella isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis // *BMC Microbiol.* – 2008. – Vol. 8, – №86.
145. OIE.Bovine brucellosis.Terr Manual Bov Brucell // [http://www.oie.int/fileadmin. Home/eng. Health_standards. tahm/2.04](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards.tahm/2.04). Internet. 2012. – 1 – 616–50.
146. Caroff M., Bundle D.R., Perry M.B., Cherwonogrodzky J.W., Duncan J.R. Antigenic S-typelipopolysaccharide of Brucella abortus 1119-3 // *Infect. Immun.*– 1984. – Vol. 46, №.2. – P. 384-388.
147. Cloeckaert A., Vizcaíno N., Paquet J., Bowden R. and Elzer P. Major outer membrane proteins of Brucella spp.: past, present and future // *Vet. Microbiol.* – 2002. – Vol. 90, – P. 229-247.
148. Belzer C.A., Tabatabai L.B. and Deyoe B. Differentiation by western blotting of immune responses of cattle vaccinated with Brucella abortus strain 19 or infected experimentally or naturally with virulent Brucella abortus // *Vet. Microbiol.* – 1991. – Vol. 27, №.1. – P. 79-90.
149. Navarro-Soto M., Morales-Loredo A., Álvarez-Ojeda G., Ramírez-Pfeiffer C., Tamez-Guerra P. and Gomez-Flores R. Recombinant proteins as antigens in serological diagnosis of brucellosis. In: Baddour M.M. Updates on Brucellosis. Rijeka, Croatia: Intech Open. – 2015. – P. 161-169.
150. Letesson J. J., Tibor A., van Eynde G., Wansard V., Weynants V., Denoel P. and Saman E. Humoral immune responses of Brucella-infected cattle, sheep, and

goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme linked immunosorbent assay // *Clin. Diagn.Lab. Immunol.* – 1997. – Vol. 4, – P. 556-564.

151. Gupta V.K., Verma D.K., Singh S.V. and Vihan V.S. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis // *Small Rumin. Res.* – 2007. – Vol. 70, – P. 260-266.

152. Lim J.J., Kim D.H., Lee J.J., Kim D.G., Min W., Lee H.J., Rhee M.H., Chang H.H. and Kim S. Evaluation of recombinant 28 kDa outer membrane protein of *Brucella abortus* for the clinical diagnosis of bovine brucellosis in Korea // *J. Vet. Med. Sci.* – 2012. – Vol. 74, №6. – P. 687-691.

153. Manat Y., Shustov A.V., Evtihova E. and Eskendirova S.Z. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species // *Open Veterinary Journal.* – 2016. – Vol. 6, №2. – P. 71-77.

154. Simborio H.L.T., Lee J.J., Reyes A.W.B., Hop H.T., Arayan L.T., Min W., Lee H.J., Yoo H.S. and Kim S. Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis // *Microb. Pathog.* – 2015. – Vol.83, №84. – P.41-46.

155. Cassataro J., Pasquevich K., Bruno L., Wallach J.C., Carlos A.F. and Pablo C.B. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucella* // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2004. – Vol. 11, №1. – P. 111-114.

156. Navarro-Soto M.C., Gomez-Flores R., Morales-Loredo A., Ramírez-Pfeiffer C., Tamez-Guerra P. and Álvarez-Ojeda G. Effective use of recombinant *Brucella ovis* Omp31 antigen to detect cattle serum antibodies by the ELISA indirect test. *Biotechnology Summit, Santa María Huatulco, Oaxaca, Mexico.* – 2014. – P. 139-143.

157. Xin T., Yang H., Wang N., Wang F., Zhao P., Wang H. Limitations of the BP26 protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis // *Clinical and vaccine immunology.* – 2013. – Vol. 20, №9. – P. 1410-1417.

158. Tiwari A.K., Kumar S., Pal V., et al. Evaluation of the recombinant 10-kilodalton immunodominant region of the BP26 protein of *Brucella abortus* for specific diagnosis of bovine brucellosis // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2011. – Vol. 18, №10. – P. 1760-1764.

159. Thavaselvam D., Kumar A., Tiwari S., et al. Cloning and expression of immunoreactive *Brucella melitensis* 28 kD outer membrane protein (Omp28) gene and evaluation of its potential for clinical diagnosis of brucellosis // *J.Med.Microbiol.* – 2010. – Vol. 56, – P. 421-428.

160. Tiwari S., Kumar A., Thavaselvam D., et al. Development and comparative evaluation of a plate enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant outer membrane antigens Omp28 and Omp31 for diagnosis of human brucellosis // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2013. – Vol. 20, №8. – P. 1217-1222.

161. Kumar S., Tuteja U., Kumar A., Batra H.V. Expression and purification of the 26 kDa periplasmic protein of *Brucella abortus*: a reagent for the diagnosis of bovine brucellosis // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2008. – Vol.49, №3. – P.213-218.
162. Gupta V.K., Kumari R., Vohra J., Singh S.V., Vihan V.S. Comparative evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in goats // *Small Rumin Res.* – 2010. – Vol. 93, – P. 119-205.
163. Chaudhuri P., Prasad R., Kumar V. et al. Recombinant OMP28 antigen – based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis // *Mol.Cell.Probes.* – 2010. – Vol. 24, – P. 142-145.
164. Seco-Mediavilla P., Verger J-M., Grayon M., Cloeckeaert A., Marín C.M., Zygmunt M.S. et al. Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis // *ClinDiagn Lab Immunol.* – 2003. – Vol. 10, – P. 647-651;
165. Zygmunt M.S., Baucheron S., Vizcaino N., Bowden R.A., Cloeckeaert A. Single-step purification and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella abortus* infection in rams. // *Vet Microbiol.* – 2002. – Vol. 87, – P. 213-20.
166. Ahmed I., Khairani-Bejo S., Hassan L., Bahaman A. and Omar A. (2015) 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.
167. Bulashev A., Akibekov O., Suranshiyev Zh., Ingirbay B. and Eskendirova S. Serodiagnostic potential of *Brucella* outer membrane and periplasmic proteins // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* – 2019. – Vol. 43, – P. 486-493.
168. Bulashev A.K., Akibekov O.S., Syzdykova A.S., Suranshiyev Zh.A., Inerbay B.K. Diagnostic value of recombinant *Brucella* Omp19 for serodiagnosis of bovine brucellosis // *Veterinary World.* – 2020. – Vol.13. №7. – P. 1439-1447.
169. Sáez D., Fernández P., Rivera A., Andrews E., Oñate A. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30, №7. – P. 1283-1290.
170. Lalsiamthara J., Won G., Lee J.H. Effect of immunization routes and protective efficacy of *Brucella* antigens delivered via *Salmonella* vector vaccine // *J Vet Sci.* – 2018. – Vol.19, №3. – P. 416-425.
171. Onate A., Cespedes S., Cabrera A., Rives C., Gonzales A. A DNA vaccine encoding Cu-Zn Superoxide Dismutase of *Brucella abortus* induced protective immunity in BALB/c mice // *Infection and Immunity.* – 2003. – Vol. 71, – №3. – P. 4857-486;
172. Retamal-Díaz A., Riquelme-Neira R., Sáez D. et al. Use of S-2,3-bisphosphatidyl-2-(2R)-propyl-R-cysteinyl-amido-monomethoxy polyethylene glycol as an adjuvant improved protective immunity associated with a DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* in mice // *Clin Vaccine Immunol.* – 2014. – Vol. 21, №11. – P. 1474-1480;

173. Escalona E., Sáez D., Oñate A Immunogenicity of a Multi-Epitope DNA Vaccine Encoding Epitopes from Cu-Zn Superoxide Dismutase and Open Reading Frames of *Brucella abortus* in Mice // Collection Front Immunol. – 2017. – Vol. 9, – P. 118-125.

174. 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. – Vol. 70, №12. – P.1387-1389.

175. Булашев А.К., Акибеков О.С., Сураншиев Ж.А., Сыздыкова А.С., Іңірбай Б.Қ. Использование белковых антигенов в серодиагностике бруцеллеза крупного рогатого скота // Вестник Казахского агротехнического университета им.С.Сейфуллина. – 2019. – №2. – С. 92-102.

176. Bulashev A., Akibekov O., Kiyan V., Tursunov K., Mukhitden G., Eskendirova S. Use of *Brucella* recombinant proteins in differentiating infected from vaccinated cattle // Proceedings of ISER 213th International conference // Hanoi, Vietnam. – 2019. – P. 6-9.

177. Díez S., Gómez B.L., McEwen J.G., Restrepo A., Hay R.J., Hamilton A.J. Combined Use of *Paracoccidioides brasiliensis* Recombinant 27-Kilodalton and Purified 87-Kilodalton Antigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of *Paracoccidioidomycosis* // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41, – №4. – P.1536-1542.

178. Bulashev A.K., Suranshiev Zh.A., Zhumalin A.Kh., Tursunov K. Evaluation of *Brucella* antigens in serological diagnosis of brucellosis // Proceedings of The IIER International Conference, Doha, Qatar. – 2016. – Vol. 6. – P. 1-3.

179. Bulashev A, Jakubowski T, Tursunov K, Kiyan V and Zhumalin A. Immunogenicity and antigenicity of *Brucella* outer membrane proteins // Veterinarija ir zootechnika. – 2018. – Vol. 76, – №98. – P. 17-24.

180. Eskendirova S, Shustov A, Evtelova E, Manat Y. Patent №30873 RK, MPK C12N 15/52, C12N1/21 Rekombinantnyy shtamm *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET22/SOD, produtsiruyushchiy Cu/Zn-zavisimuyu superoksid-dismutazu / Eskendirova S, Shustov A, Evtelova E, Manat Y; zayavitel' i patentoobladatel' Natsional'nyy tsentr po biotekhnologii RK.- № 2014/1335.1; Zayavleno – 17.10.2014; Opublikovano 25.12. 2015, Byulleten' №12.-5.

181. Bulashev, A.K., Tursunov, K.T., Kairova, Z.K. and Syzdykova, A. Obtaining the strain producing recombinant *Brucella abortus* Omp19 and studying its antigenicity. Bull. KazATU. – 2018. – Vol. 98, – №3. – P. 117-128.

182. Tibor, A., Saman, E., de Wergifosse, P., Cloeckert, A., Limet, J.N. and Letesson, J.J. Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus* // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64, – №1. – P. 100-107.

183. Wergifosse, P., Lintermans, P., Limet, J. and Cloeckert, A. Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* // J. Bacteriol. – 1995. – Vol. 177, – №7. – P. 1911-1914.

184. Vizcaino, N., Kittelberger, R., Cloeckert, A., Marin, C.M. and Fernandez-Lago, L. Minor nucleotide substitutions in the Omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species // *Infect. Immun.* –2001. – Vol. 69, – №11. – P. 7020-7028.
185. Bulashev, A.K., Ingirbay, B.K., Mukantayev, K.N. and Syzdykova, A.S. Evaluation of chimeric proteins for serological diagnosis of brucellosis in cattle // *Vet. World.* – 2021. – Vol. 14, – №8. – P. 2187-2196.
186. Ahmed I, Khairani-Bejo S, Hassan L, Bahaman A, Omar A. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay // *BMC Veterinary Research.* – 2015. – Vol. 11, – №275. – P. 2-10.
187. Laboratory diagnosis of brucellosis. Serological methods. Interstate Council for Standardization, Metrology and Certification // *GOST 34105-2017.*- Moscow, Standartinform. – 2017.
188. Saiduldin, T.S. Statistical analysis of the results of serological tests. *Veterinariya.* – 1981. – Vol. 7, – P. 62-66.
189. Nevolko O. Monitoring of Brucellosis in Agricultural Animals in Ukraine During 2013-2015 // *Online J Public Health Inform.* – 2017. – Vol. 9, №1. – P. 156.
190. [http:// www.dissercat.com /content/ brutsellez – v – rossii - sovremennaya-epidemiologiya-i-laboratornaya - diaagnostika.](http://www.dissercat.com/content/brutsellez-v-rossii-sovremennaya-epidemiologiya-i-laboratornaya-diaagnostika)
191. Banai M., Corbel M. Taxonomy of *Brucella* // *The Open Veterinary Science Journal.* 2010. – Vol4, – P. 85-101.
192. Вершилова П.А., Голубева А.А. Бруцеллез в СССР и пути его профилактики // М.: Медицина. – 1970. – С. 191.
193. Вершилова П.А. Бруцеллез // М.: Медицина; – 1972. – С. 439.
194. Brew S.D., Perrett L.L., Stack, J.A. et al. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet. Rec.* – 1999. – Vol. 144, – №17. – P. 483.
195. Абсатиров Г.Г. О необходимости коррекции системы противобруцеллезных мероприятий // *Ветеринария.* – 2015.– №2. – С. 54-57.
196. Лямкин Г.И., Головнева С.И., Худолеев А.А., Чеботарева Е.Н., Шакирова Л.И., Куличенко А.Н. Обзор эпизоотической и эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2013 г и прогноз на 2014 г. *Проблемы особо опасных инфекций* // – 2014. №2. – С. 29 – 32.
197. Al Dahouk S., Tomaso H., Nöckler K., Neubauer H., Frangoulidis D. Laboratory-based diagnosis of brucellosis – a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis // *Clin. Lab.* – 2003. – Vol. 49, – P. 577-589.
198. Плотникова Э.М., Салмаков К.М., Иванов А.В. Иммуномониторинг бруцеллеза животных // *Ветеринария.* – 2010. – №5. – С. 26-30.
199. Sacchini F. V., 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, – 2014. – P.118.

200. Pajuaba A.C., Silva D.A.O., Almeida K.C., Cunha-Junior J.P., Pirovani C.P. et al. Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals differential antibody profiles between S19-vaccinated and naturally infected cattle // *Proteomics*. – 2012. Vol.12, – P. 820-831.
201. Nielsen K., Yu W. Serological diagnosis of brucellosis // *Prilozi*. – 2010. – Vol. 31, – P. 65-89.
202. Poester F.P., Nielsen K., Samartino L.E., Yu WL. Diagnosis of brucellosis. // *Open Veterinary Science Journal*. – 2010. – Vol. 4. – P.46-60.
203. Ferreira, A., Cardoso, R., Dias, I., Mariano, I., Belo, A., Rolão Preto, I., Manteigas, A., Pina Fonseca, A. And Corrêa De Sá M.I. Evaluation of a modified rose Bengal test and indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep // *Vet. Res.* – 2003. Vol. 34, №3 – P. 297-305.
204. Díaz B., Casanova, A., Ariza, J. and Moriyón J. The rose Bengal test in human brucellosis: A Neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2011. Vol. 5, №4. – e950.
205. Lyamkin, G.I., Ponomarenko, D.G., Khudoleev, A.A., Vilinskaya, S.V., Zaytsev, A.A. and Kulichenko, A.N. The epidemiological situation of brucellosis in the Russian Federation and the member states of the Commonwealth of Independent States // *Inf. Dis.* – 2016. – P. 68-74.
206. Vizcaino, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S. and Dubray, G. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* Omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein // *Infect. Immun.* – 1996. Vol. 64, №9. – P. 3744-3751.
207. Kovach, M.E., Elzer, P.H., Robertson, G.T., Chirhart- Gilleland, R.L., Christensen, M.A., Peterson, K.M. and Roop, R.M. Cloning and nucleotide sequence analysis of a *Brucella abortus* gene encoding an 18 kD immunoreactive protein // *Microb. Pathog.* – 1997. Vol. 22, №4. – P. 241-246.
208. Mailybayeva, A., Yespembetov, B., Ryskeldinova, S., Zinina, N., Sansyrbay, A., Renukaradhya, G.J., Petrovsky, N. and Tabynov, K. Improved influenza viral vector based *Brucella abortus* vaccine induces robust B and T-cell responses and protection against *Brucella melitensis* infection in pregnant sheep and goats // *PLoS One*. – 2017. Vol. 20, №10. e0186484.
209. Paul, S., Peddayelachagiri, B.V., Nagaraj, S., Konduru, B. and Batra, H.V. Protective and therapeutic efficacy study of divalent fusion protein rL7/L12-Omp25 against *B. abortus* 544 in presence of IFN γ // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 102, №20. – P. 8895-8907.
210. Cassataro, J., Pasquevich, K., Bruno, L., Wallach, J.C., Carlos, A.F. and Pablo, C.B. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucella*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* // – 2004. – Vol. 11, №1. – P. 111-114.
211. Gupta, V.K., Verma, D.K., Singh, S.V. and Vihan, V.S. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis // *Small Rumin. Res.* – 2007. – Vol. 70, №2-3. – P. 260-266.

212. Greenfield, E.A., DeCaprio, J. and Brahmandam, M. Making weak antigens strong: Modifying protein antigens by denaturation. *Cold Spring Harb // Protoc.* – 2018. – Vol. 5.

213. 167[Bulashev, A., Akibekov, O., Suranshiyev, Z.A., Ingirbay, B. and Eskendirova, S. Serodiagnostic potential of *Brucella* outer membrane and periplasmic proteins // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* – 2019. – Vol. 43, №4. – P. 486-493.

214. Xu, J., Qiu, Y., Cui, M., Ke, Y., Zhen, Q., Yuan, X., Yu, Y., Du, X., Yuan, J., Song, H., Wang, Z., Gao, G., Yu, S., Wang, Y., Huang, L. and Chen, Z. Sustained and differential antibody responses to virulence proteins of *Brucella melitensis* during acute and chronic infections in human brucellosis // *EJCMID.* – 2013. – Vol. 32, №3. – P. 437-447.

215. Kumar, A., Gupta, V.K., Verma, A.K., Kumar, S.V., Singh, A. and Reddy, N.C.P. Seroprevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in western Uttar Pradesh, India // *Ind. J. Anim. Sci.* – 2016. – Vol. 86, №2. – P. 131-135.

216. Karevan, G., Ahmadi, K., Taheri, R.A. and Fasihi-Ramandi, M. Immunogenicity of glycine nanoparticles containing a chimeric antigen as *Brucella* vaccine candidate // *Clin. Exp. Vaccine Res.* – 2021. – Vol. 10, №1. – P. 35-43.

217. Mohammadi, E. and Golchin, M. Detection of *Brucella abortus* by immunofluorescence assay using anti outer membrane protein of 19 kDa antibody. *Adv.Clin. Exp. Med.* – 2018. – Vol. 27, № 5. – P. 643–648.

218. Gupta, V.K., Verma, D.K., Singh, S.V. and Vihan, V.S. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis. *Small Rumin // Res.* – 2007. – Vol. 70, №2-3. – P. 260-266.

219. Rosales, J-D., Ochoa, A.C., Reyna-Bello, A., Serrano, A. and Fernández-Gomez, R. Cloning, expression and immunological evaluation of the Omp31 protein of *Brucella melitensis* and evaluation of its possible use for diagnosis in bovine brucellosis // *Rev. Inv. Vet. Perú.* – 2018. – Vol. 29, №3. – P. 996-1008.

А-ҚОСЫМШАСЫ

Микроорганизмді депонирлеу куәлігі

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІНІҢ
«МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
КОЛЛЕКЦИЯСЫ» ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ
ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ ХОЗЯЙСТВЕННОГО
ВЕДЕНИЯ «РЕСПУБЛИКАНСКАЯ
КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ»
КОМИТЕТА НАУКИ МИНИСТЕРСТВА
ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

010000, Нур-Султан қ., Ш. Уәлиханов, 13/1
тел./факс: + 7 (7172) 20 10 32
E-mail: rcm-info@mail.ru; www.rcm.kz
БСН 061140003586

010000, г. Нур-Султан, ул. Ш. Уәлиханова, 13/1
тел./факс: + 7 (7172) 20 10 32
E-mail: rcm-info@mail.ru; www.rcm.kz
БИН 061140003586

02.11.2020 г. № 09/12-367
№ _____ г.е

СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНИРОВАНИИ МИКРООРГАНИЗМА

Кому: Інірбай Б.Қ., Булашеву А.Қ., Мукантаеву К.Н., Сыздықовой А.С., Сүраншиеву Ж.А., Акибекову О.С., Турсунову К.А.
(имя и/или наименование организации и адрес депозитора, которым выдается свидетельство о депонировании)

НАО «Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина»

1. НАЗВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМА

Escherichia coli BL 21(DE3) Pet28a/Omp19/31

Опознавательная ссылка (номер, ссылка
и т.п., присвоенный штамму
депозитором)

BL 21(DE3) Pet28a/Omp19/31

Коллекционный номер,
присвоенный коллекцией

B- RKM 0913

2. НАУЧНОЕ ОПИСАНИЕ И/ИЛИ ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМА

Род: *Escherichia*
Вид: *coli*

Микроорганизмы, поименованные в пункте 1, сопровождаются ходатайством о депонировании, включающем



¹ Паспорт



¹ Справку о
патогенности

001671

3. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИНЯТИЕ

Настоящим утверждается, что консорциум бактериальных культур микроорганизмов, поименованный в пункте 1, депонирован в **Республиканской коллекции микроорганизмов с целью патентного депонирования.**

Дата депонирования
02.11.2020 г.

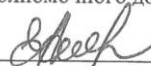
4. КОЛЛЕКЦИЯ

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов»


Название коллекции:
**РГП «Республиканская коллекция
микроорганизмов»**

Центральный музей микроорганизмов

Подпись лица, уполномоченного,
представлять коллекцию, или
полномочного должностного лица:

 **Ескараева А.А.**

И.о. генерального директора
**РГП «Республиканская
коллекция микроорганизмов»**

 **Темирханов А.Ж.**

2020 г.

Адрес коллекции

**010000, г.Нур-Султан,
ул. Ш. Уәлиханова, 13/1
факс 8 (7172) 20-10-32
e-mail: rcm-info@mail.ru**



Ә-ҚОСЫМШАСЫ

Авторлық куәлік

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ **РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН**

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 35776

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION



(21) 2021/0301.1
(22) 17.05.2021
(45) 29.07.2022

(54) Escherichia coli BL21(DE3) pET28a/Omp19/31 брудцелланың сыртқы мембранасының химерлік рекомбинантты ақуызын өндіретін микроорганизм штаммы
Штамм микроорганизма Escherichia coli BL21(DE3) pET28a/Omp19/31 - продуцент химерного рекомбинантного белка внешней мембраны брудцелл
Escherichia coli BL21(DE3) pET28a/Omp19/31 microbial strain - producer of chimeric recombinant protein of Brucella outer membrane

(73) «Сәкен Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)
Некоммерческое акционерное общество «Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина» (KZ)
Non-profit joint stock company «Kazakh Agrotechnical University named after Saken Seifullin» (KZ)

(72) Булашев Айгбай Кабыкешович (KZ) Ақібеков Оркен Сұлтанхамитович (KZ) Іңірбай Бақытқали Кабылы (KZ) Мұқантәев Канатбек Найзабекович (KZ) Сыздықова Альфия Сафиоллеевна (KZ) Сураншиев Жанболат Амреевич (KZ) Турсунов Канат Ахметович (KZ)	Bulashev Aitbay Kabaykeshovich (KZ) Akibekov Orken Sultanhamitovich (KZ) Ingirbay Bakytkali Kabuly (KZ) Mukaqtayev Kanatbek Naizabekovich (KZ) Syzydykova Alfiya Safiollaevna (KZ) Suranshiyev Zhanbolat Amreevich (KZ) Tursunov Kanat Akhmetovich (KZ)
---	---



ЭЦК қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

Е. Оспанов
Е. Оспанов
Y. Ospanov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМҚ директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 35776

(51) C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0301.1

(22) 17.05.2021

(45) 29.07.2022, бюл. №30

(72) Булашев Айтбай Кабыкешович; Акибеков Оркен Султанхамитович; Инірбай Бақытқали Қабірұлы; Мукантаев Канатбек Найзабекович; Сыздыкова Альфия Сафиоллаевна; Сураншиев Жанболат Амреевич; Турсунов Канат Ахметович

(73) Некоммерческое акционерное общество «Казакский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина»

(56) KZ 33124 B, 24.09.2018

KZ 30873 B, 25.12.2015

KZ 32105 B, 30.05.2017

RU 2575621 C1, 20.06.2016

(54) **ШТАММ МИКРООРГАНИЗМА
ESCHERICHIA COLI BL21(DE3)
PET28A/OMP19/31 - ПРОДУЦЕНТ
ХИМЕРНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА
ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ БРУЦЕЛЛИ**

(57) Изобретение относится к биотехнологии, а именно к генной инженерии и может быть использовано в ветеринарии, а также в медицине в разработке и производстве диагностических тест-систем для обнаружения противобруцеллезных антител в сыворотке крови.

Сущность изобретения состоит в конструировании штамма *E. coli* - продуцента химерного антигена, состоящего из иммунодоминантных фрагментов белков внешней мембраны *Brucella spp.* с мол.м. 19 кДа (БВМ19) и 31 кДа (БВМ31), путем моделирования гена *in silico* и синтеза его *de novo*.

Техническим результатом изобретения является штамм микроорганизма, продуцирующий химерный рекомбинантный белок рБВМ 19/31 с мол.м. 32 кДа, имеющем в своем составе диагностически важные участки минорного (БВМ19) и мажорного (БВМ31) белков *Brucella spp.*

(19) KZ (13) B (11) 35776

Данные таблицы 2 показывают, что рБВМ 19/31 по своей антигенности не уступает своему прототипу рБВМ ВаВм, однако достоверно превосходит его по среднему показателю ОПн/ОПк ($P \leq 0,05$), который характеризует прочность комплекса антиген-антитело, что является одним из важных критериев при подборе антигенов для разработки ИФА-тестов. Чувствительность н-ИФА на основе химерных белков была ниже на 3,4%, чем у РБП+РСК. Здесь следует отметить, что классические тесты, использующие в качестве антигена бактериальные клетки, могут давать ложноположительные результаты из-за связывания не специфических антител с ЛПС бруцелл. Противобруцеллезные антитела не были обнаружены как в н-ИФА/рБВМ 19/31, так и н-ИФА/рБВМ ВаВт у 3-х коров, причем, как видно из таблицы 2, серонегативность у этих животных взаимно не подтверждалась. Объективная оценка диагностической ценности использованных вариантов ИФА-теста может быть дана в сравнении с бактериологическим анализом и/или полимеразно-цепной реакцией. Таким образом, химерный рекомбинантный белок рБВМ 19/31, продуцируемый штаммом *E. coli* BL21(DE3) рЕТ28а/Отр 19/31, может быть использован в разработке ИФА-диагностикума, позволяющего с высокой достоверностью выявлять животных, инфицированных бруцеллезом.

Техническим результатом изобретения является штамм микроорганизма, продуцирующий химерный рекомбинантный белок с мол.м. 32 кДа, имеющем в своем составе диагностически важные участки минорного (БВМ19) и мажорного (БВМ31) белков *Brucella spp.*

Штамм микроорганизма *E. coli* BL21(DE3) рЕТ28а/Отр 19/31 - продуцент химерного рБВМ 19/31 бруцелл. Штамм получен путем трансформации экспрессионной плазмиды рЕТ28а со встроенным геном, ответственным за синтез иммунодоминантных участков БВМ19 и БВМ31 *Brucella spp.*, в компетентные *E. coli* штамма BL21(DE3). Клетки выращивают в 100 мл среды LB с ампициллином до $OD_{600} \sim 0,6$ при 37°C. По

достижении необходимой плотности добавляют 0,5 мМ ИППГ и культивируют в течение 16-18 часов при комнатной температуре. После этого, клетки осаждают центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 минут при 4°C, осадок ресуспендируют в 10 мл TNE буфера (20 мМ Трис pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl). Клетки разрушают ультразвуком (22 kHz, 4 раза по 120 секунд), нерастворимую фракцию отделяют центрифугированием при 13000 об/мин в течение 60 минут. Нерастворимую фракцию (осадок) ресуспендируют в 10 мл буфера I (20 мМ HEPES, 1М мочевиной, 10 мМ 2-меркаптоэтанол), инкубируют 30 минут на орбитальном шейкере при комнатной температуре, затем центрифугируют при 13000 об/мин в течение 30 минут. Нерастворимую фракцию ресуспендируют в буфере II для металл-аффинной хроматографии (20 мМ HEPES, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 8 мМ мочевины, 10 мМ 2-меркаптоэтанол) и обрабатывают ультразвуком (22 kHz, 1 раз 60 секунд). После обработки ультразвуком суспензию инкубируют 30 минут на орбитальном шейкере при комнатной температуре, затем центрифугируют при 6000 об/мин в течение 20 минут, нерастворимую фракцию отбрасывают. Рекомбинантный белок из надосадочной жидкости очищают на колонке HisTag. Элюцию проводят буфером для металл-аффинной хроматографии содержащим 8М мочевины и 500 мМ имидазол. Ренатурированный белок анализируют денатурирующим электрофорезом в 12% ПААГ-ДСН.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штамм микроорганизма *Escherichia coli* BL21(DE3) рЕТ28а/Omp19/31 - продуцент химерного рекомбинантного белка внешней мембраны бруцелл с мол. м. 32 кДа, состоящий из иммунодоминантных фрагментов БВМ19 и БВМ31 *Brucella spp.*, депонирован в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК под регистрационным номером В-РКМ 0913.

Б-ҚОСЫМШАСЫ

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан
НАО «Казахский агротехнический университет им.С. Сейфуллина»

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Председателя Правления по научной
и инновационной
деятельности И.Т.Токбергенов
« 23 » 09 / 2022 г.



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ изготовления и использования «ИФА-набора для диагностики бруцеллеза»

Нур-Султан, 2022

Лабораторный регламент разработан на основе результатов выполнения проекта «Серологическая диагностика бруцеллеза на основе комбинированного антигена» (№ госрегистрации 0118РК00970) по научно-технической программе № BR05236307 «Создание новых препаратов и инновационных биотехнологий для сельского хозяйства и ветеринарии» на 2018-2020 годы согласно договора № 2 от 20 апреля 2018 года и дополнительного соглашения № 1 к договору на выполнение научно-исследовательских работ от 17 января 2019 года, заключенных с Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Лабораторный регламент обсужден и утвержден на заседании научно-технического совета НАО «Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина», протокол № 9 от 23.09.2022 г.

ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Дата введения «05» 08 2022 г.

Срок действия регламента «05» 08 2027 г.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
1. Введение.....	5
2. Характеристика конечной продукции	5
3. Технологический процесс изготовления «ИФА-набора для диагностики бруцеллеза».....	6
4. Переработка и обезвреживание отходов	9
5. Контроль производства и управление технологическим процессом.....	9
6. Техника безопасности, охрана окружающей среды, пожарная безопасность и производственная санитария.....	9
7. Наименование и спецификации оборудования, необходимое для изготовления компонентов набора.....	10
8. Перечень и характеристика материалов, используемых при изготовлении набора.....	11
9. Информационные материалы.....	13

9.10Бұлашев А.Қ., Іңірбай Б.Қ., Сыздыкова А.С., Курмашева А.К. Бруцеллалардың мультипротеиндерін дайындау және олардың иммунореактивтілігін зерттеу// Ж. Биотехнология: Теория и практика.-2021.-№ 1.

Разработчики:

Доктор ветеринарных наук, профессор

Научный сотрудник, магистр наук

Кандидат ветеринарных наук,

ассоциированный профессор

Кандидат ветеринарных наук, доцент

Магистр технических наук



А.К. Булашев

Б.Қ. Іңірбай

О.С. Акибеков

Ж.А. Сураншиев

А.С. Сыздыкова

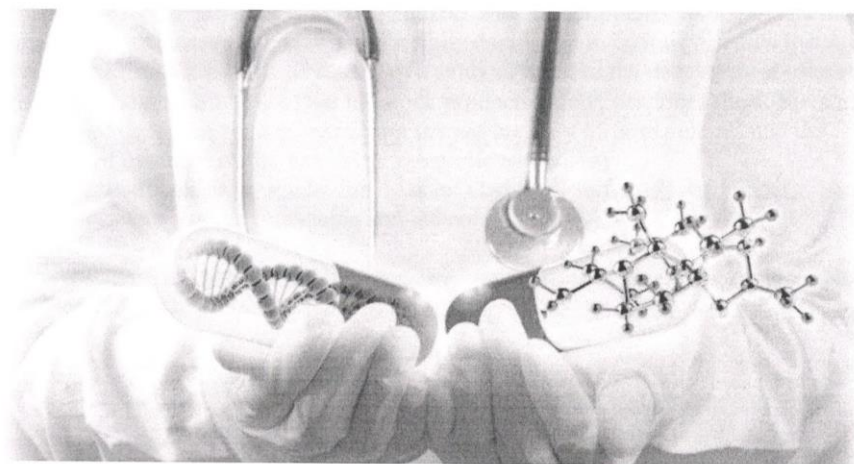
В-ҚОСЫМШАСЫ



Бруцеллезді диагностикалауға арналған ИФТ-жиынтығы

Aitbay K. Bulashev

**Modern problems of Biotechnology
in Veterinary Medicine and Animal
Husbandry**



Astana 2022

UDC 60:619:636(075.8)
LBC 47.114:48:45/46я73
B89

Reviewers:

Kasym K. Mukanov, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Chief Researcher, Applied Genetics Laboratory, National Center for Biotechnology;

Altai E. Usenbaev, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Department of Veterinary Medicine, NJSC "S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University".

ISBN 978-601-257-417-3

Modern problems of Biotechnology in Veterinary Medicine and Animal Husbandry: Textbook. /Aitbay K. Bulashev./- Astana: Publishing House of NJSC "S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University", 2022.-125 p.

The textbook introduces Master students with modern biotechnological methods in the diagnosis and prevention of some especially dangerous infectious diseases that are relevant for Kazakhstan, and the results of a study devoted to the development of new methods for express analysis of the livestock products safety; describes the achievements of biotechnology in the field of increasing the productivity of farm animals and the production of essential medicines using transgenic technology.

The textbook is a guide for Master students' self-study of modern issues of biotechnology in veterinary medicine and animal husbandry.

Approved for publication by the Academic Council of KazATU, protocol No. 3, December 22, 2022

UDC 60:619:636(075.8)
LBC 47.114:48:45/46я73

ISBN 978-601-257-417-3

© Aitbay K. Bulashev, 2022
© Seifullin KazATU

Content

S/S	Section and Subsection Titles	P
	Abbreviations.....	3
	Preface.....	6
1	New methods for diagnosing especially dangerous infectious diseases.....	7
1.1	The new methods for diagnosis of brucellosis.....	7
1.1.1	Current epidemiology of Brucellosis.....	8
1.1.2	Use of <i>Brucella</i> outer membrane proteins in improving the diagnosis of brucellosis.....	12
1.2	The new techniques for diagnosis of tuberculosis.....	17
1.2.1	Advances in microscopy and culture.....	18
1.2.2	Research progress in nucleic acid amplification of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.2.3	Advances in the detection of drug resistance.....	21
1.2.4	Advances in the immunodiagnosis of tuberculosis.....	23
1.3	Detection and identification of <i>Bacillus anthracis</i>.....	25
1.3.1	General characteristics of <i>Bacillus anthracis</i>	25
1.3.2	DNA amplification based identification of <i>Bacillus anthracis</i>	29
1.3.3	Identification of <i>Bacillus anthracis</i> antigen.....	30
1.3.4	Aptamers and peptide-nucleic acid chimera probes.....	33
1.3.5	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry	35
1.4	Conventional and newer diagnostic tests for rabies	36
1.4.1	General characteristics of the disease.....	36
1.4.2	Traditional diagnostic tests for rabies.....	37
1.4.3	Modern diagnostic tests for rabies.....	40
1.4.4	Other assays for rabies virus identification	44
1.4.5	Detection of antibodies and proteomics.....	45
2	Biotechnology of vaccines.....	47
2.1	Research progress in Vaccine Development.....	47
2.2	Brucellosis vaccines development and improvement trends.....	62
3	New methods for determining the sanitary quality of food.....	71
3.1	Impact on consumers' health.....	71
3.2	Status and prospects for improving express methods for detecting antibiotic residues in food products.....	73
4	The application of biotechnology on livestock feed improvement.....	84
4.1	Biotechnology in animal feeding.....	84

4.2	Biotech products as feed additives.....	88
4.3	Use of microorganisms as a source of protein.....	91
5	Recent advances in micromanipulation and transgenesis in food producing animals.....	96
5.1	In vitro embryo production.....	98
5.2	Micromanipulation of embryos.....	99
5.3	Gene transfer by nuclear microinjection.....	104
6	Transgenic animals in agriculture.....	107
7	Transgenic animals in human medicine.....	110
7.1	Transgenic animal models of diseases.....	112
7.2	Products from transgenic animals.....	113
7.3	Drugs from transgenic animals and other applications.....	114
7.4	Future prospects	116
8	References.....	117

Review Questions

- 1 What examples do you know of using transgenic animals to study various diseases?
2. What medicines are obtained from transgenic animals and what are under development?
3. Talk about problems with drugs from transgenic animals.
4. Name the two main strategies that have been studied for the long-term suppression of hyperacute rejection caused by xenotransplantation of pig organs into humans.
5. What transgenic technologies may appear in the future?

8. References

- 1 Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L. and Tsianos E.V. The new global map of human brucellosis // *Lancet Infect. Dis.* -2006-V. 6(2).-P. 91-99.
- 2 Navarro-Soto M., Morales-Loredo A., Álvarez-Ojeda G., Ramírez-Pfeiffer C., Tamez-Guerra P. and Gomez-Flores R. Recombinant proteins as antigens in serological diagnosis of brucellosis. In: Baddour, M.M., editor. *Updates on Brucellosis*. Intech Open, Rijeka, Croatia.- P.161-169.
- 3 Cloeckert 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.-V. 147 (4).-P. 225-235.
- 4 Gupta V., Verma V.K., Singh D.K., and Vihan V.S. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis // *Small Rumin. Res.*- 2007.-V. 70(2-3).-P. 260-266.
- 5 Manat Y., Shustov A.V., Evtehova E. and Eskendirova S.Z. Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant OMP28 protein of *Brucella* species // *Open Vet. J.* -2016.-V. 6(2).-P. 71-77.
- 6 Tsogtbaatar G., Tachibana M., Watanabe K., Kim R., Suzuki H. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening of canine brucellosis using recombinant Cu-Zn superoxide dismutase // *Journal of Veterinary Medical Science*.- 2008.-V. 70 (12).-P. 1387-1389.
- 7 Abkar M., Lotfi A.S., Amani J., Eskandari K., Ramandi M.F., Salimian J., Brujeni G., Alamian S., Kamali M. and Koushki H. Survey of Omp19 immunogenicity against *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: Influence of nanoparticulation versus traditional immunization // *Vet. Res. Commun.*- 2015.- V.39(4).-P. 217-228.
- 8 Verma S., Rawat M., Kumawat S., Qureshi S., Mohd G. and Tiwari A.K. Protective role of *Brucella abortus* specific murine antibodies in inhibiting systemic proliferation of virulent strain 544 in mice and guinea pig // *Vet. World*.- 2018.-V. 11(6).-P. 794-799.

9 Bulashev A., Akibekov O., Syzdykova A., Suranshiyev Z., Ingirbay B. Use of recombinant Brucella outer membrane proteins 19, 25, and 31 for serodiagnosis of bovine brucellosis // *Veterinary World*- 2020.-V. 13(7).-P. 1439-1447.

10 Simborio H.L.T., Lee J.J., Reyes A.W.B., Hop H.T., Arayan L.T., Min W., Lee H.J., Yoo H.S. and Kim S. Evaluation of the combined use of the recombinant Brucella abortus Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis // *Microb. Pathog.* -2015.-V. 83(84).- P. 41-46.

11 Ahmed I., Khairani-Bejo S., Hassan L., Bahaman A. and Omar A. 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.-V. 11 : 275.

12 Yin D., Bai Q., Li L., Xu K. and Zhang J. Study on immunogenicity and antigenicity of a novel Brucella multiepitope recombinant protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2021.-V.540.-P.37-41.

13 Dehghani S., Sabzehei F., Taromchi A.M., Mobaien A.R. and Arsang-Jang S. Hybrid recombinant Omp 22, 25, and 31 immunodominant epitopes can be used for serodiagnosis of brucellosis // *J. Immunol. Methods.* -2021.-V.497.-P. 113-123.

14 Bulashev A.K., Ingirbay B.K., Mukantayev K.N. and Syzdykova A. Evaluation of chimeric proteins for serological diagnosis of brucellosis in cattle // *Veterinary World*.- 2021.- V.14(8).-P. 2187-2196.

15 Mohammadi E. and Golchin M. Detection of Brucella abortus by immunofluorescence assay using anti outer membrane protein of 19 kDa antibody // *Adv.Clin. Exp. Med.* - 2018.-Vol.27(5).-P.643–648.

16 Gupta V.K., Verma D.K., Singh S.V. and Vihan V.S. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from Brucella melitensis in goat and sheep brucellosis // *Small Rumin. Res.* -2007.- V.70(2-3).-P. 260-266.

17 Rosales J-D., Ochoa A.C., Reyna-Bello A., Serrano A. and Fernández-Gomez R. Cloning, expression and immunological evaluation of the Omp31 protein of Brucella melitensis and evaluation of its possible use for diagnosis in bovine brucellosis // *Rev. Inv. Vet. Perú.* - 2018.-V.29(3).- P.996-1008.

18 Nyendak M., Lewinsohn D. and Lewinsohn D. New Diagnostic Methods for Tuberculosis // *Curr. Opin. Infect. Dis.* -2009.- V. 22(2).-P. 174–182.

19 Zasada A.A. Detection and Identification of Bacillus anthracis; From Conventional to Molecular Microbiology Methods // *Microorganisms.* -2020.- V.8.- P.125-133.

20 Israeli M., Rotem S., Elia U., Bar-Haim E., Cohen O., Chitlaru T. A simple luminescent adenylate-cyclase functional assay for evaluation of Bacillus anthracis edema factor activity // *Toxins.* - 2016.- V.8.-P.243-250.

Д-ҚОСЫМШАСЫ

“SÄKEN SEIFÝLLIN atyndaǵy QAZAQ
AGROTEHNİKALYQ ÝNİVERSİTETİ”
KOMMERSIALYQ EMES
AKSIONERLİK QOǴAMY

Basqarma tóraǵasynyń ǵylym, innovatsıalyq qyzmet
jáne halyqaralyq bailystar jónindegi orynbasary



SAKEN SEIFULLIN
UNIVERSITY

NON-COMMERCIAL
JOINT STOCK COMPANY
“SAKEN SEIFULLIN KAZAKH
AGROTECHNICAL UNIVERSITY”

Deputy Chairman of the Board for Science,
Innovation and International Affairs

010011. Nur-Sultan qalasy. Jenis dańǵyly. 62 úr
tel: (717-2) 317-564
e-mail: agun.katu@gmail.com. www.kazatu.kz

010011. Nur-Sultan city. 62. Zhenis avenue
tel: (717-2) 317-564
e-mail: agun.katu@gmail.com. www.kazatu.kz

14.10. 2020 № 13005/670

№ _____ gc

**Комитет науки
Министерства образования и науки
Республики Казахстан**

010000, г. Нур-Султан, ул. Мәңгілік Ел, 8

СПРАВКА О ВНЕДРЕНИИ

Настоящим подтверждаем, что технологические новшества, использованные в разработке Лабораторного регламента изготовления и применения «ИФА-набора для диагностики бруцеллеза» в рамках проекта: «Серологическая диагностика бруцеллеза на основе комбинированного рекомбинантного антигена» по НТП № BR05236307 «Создание новых препаратов и инновационных биотехнологий для сельского хозяйства и ветеринарии» на 2018-2020 годы (бюджетная программа 217 «Развитие науки»), внедрены в НИР Научно-исследовательской платформы сельскохозяйственной биотехнологии НАО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина по совершенствованию методов диагностики инфекционных болезней.

**Заместитель Председателя Правления
по науке, инновационной деятельности
и международным связям**

И.Т. Токбергенов

Исп. Булашев А.К
8(701)5168406

0000676

Е-ҚОСЫМШАСЫ

Кесте – Қазақстан Республикасында қой бруцеллезі бойынша эпизоотиялық ахуалы (2013-2021жж.)

№	Аудан	2013 жыл			2014 жыл			2015 жыл		
		Нақты зерт.	Оң	Жүк. %	Нақты зерт.	Оң	Жүк. %	Нақты зерт.	Оң	Жүк. %
1	Ақмола обл.	475,466	2,151	0.45	441,045	2,684	0.61	472,731	2,274	0.48
2	Ақтөбе обл.	1,272,205	3,514	0.28	816,987	3,953	0.48	1,065,330	3,570	0.34
3	Алматы обл.	2,524,249	6,339	0.25	2,269,125	9,407	0.41	2,949,228	7,252	0.25
4	Атырау обл.	630,342	1,206	0.19	539,179	1,853	0.34	569,266	1,813	0.32
5	ШҚО	1,846,384	7,680	0.42	1,635,261	11,755	0.72	2,292,458	8,043	0.35
6	Жамбыл обл.	1,997,377	9,145	0.46	1,953,593	11,647	0.60	1,989,035	5,175	0.26
7	БҚО	805,565	2,042	0.25	724,335	2,077	0.29	1,075,349	2,888	0.27
8	Қарағанды обл.	771,872	343	0.04	666,144	932	0.14	1,277,669	1,024	0.08
9	Қызылорда обл.	804,370	502	0.06	671,469	916	0.14	497,741	197	0.04
10	Қостанай обл.	404,311	558	0.14	300,000	672	0.22	359,902	266	0.07
11	Маңғыстау обл.	612,417	0	0.00	427,316	0	0.00	403,341		
12	Павлодар обл.	552,310	205	0.04	509,992	1,371	0.27	593,203	889	0.15
13	СҚО	342,783	79	0.02	283,339	34	0.01	327,674	24	0.01
14	Түркістан обл.	4,246,087	2,336	0.06	4,190,421	2,983	0.07	3,242,790	1,454	0.04
15	Нұр-Сұлтан қ.							3990		0.00
16	Алматы қ.							605	2	0.33
17	Шымкент қ.									
	барлығы	17,285,738	36,100	0.21	15,428,206	50,284	0.33	17,120,312	34,871	0.20

№	Аудан	2016 жыл			2017 жыл			2018 жыл		
		Нақты зерт.	Оң	Жүк. %	Нақты зерт.	Оң	Жүк. %	Нақты зерт.	Оң	Жүк. %
1	Ақмола обл.	576,358	1,854	0.32	753,404	1,305	0.17	781,426	909	0.12
2	Ақтөбе обл.	1,288,350	1,479	0.11	1,418,737	1,714	0.12	1,530,193	907	0.06
3	Алматы обл.	3,688,691	5,514	0.15	4,211,681	3,364	0.08	4,778,859	2,656	0.06
4	Атырау обл.	964,051	2,902	0.30	812,980	3,097	0.38	816,502	3,835	0.47
5	ШҚО	2,668,134	4,727	0.18	2,764,727	5,115	0.19	2,683,864	3,334	0.12
6	Жамбыл обл.	2,894,080	3,407	0.12	3,431,594	2,899	0.08	3,691,147	1,901	0.05
7	БҚО	1,589,898	1,162	0.07	1,544,609	2,105	0.14	1,783,967	1,191	0.07

8	Қарағанды обл.	1,669,031	242	0.01	1,486,004	216	0.01	1,482,730	148	0.01
9	Қызылорда обл.	869,377	134	0.02	771,165	204	0.03	853,013	111	0.01
10	Қостанай обл.	675,206	168	0.02	576,808	202	0.04	610,986	366	0.06
11	Маңғыстау обл.	472,463	2	0.00	458,892			520,499		
12	Павлодар обл.	850,062	516	0.06	757,161	351	0.05	794,783	254	0.03
13	СҚО	633,139	15	0.00	530,352	36	0.01	560,285	26	0.00
14	Түркістан обл.	3,803,742	1,415	0.04	4,927,344	1,081	0.02	5,430,341	793	0.01
15	Нұр-Сұлтан қ.	3954		0.00	3948		0.00	3970		0.00
16	Алматы қ.	1646	5	0.30	1893	13	0.69	2438	4	0.16
17	Шымкент қ.							124,104	22	0.02
	барлығы	22,648,182	23,542	0.10	24,451,299	21,702	0.09	26,449,107	16,457	0.06

№	Аудан	2019 жыл			2020 жыл			2021 жыл		
		Нақты зерт.	Оң	Жүк. %	Нақты зерт.	Оң	Жүк. %	Нақты зерт.	Оң	Жүк. %
1	Ақмола обл.	782,462	393	0.05	515,418	80	0.02	679,517	277	0.04
2	Ақтөбе обл.	1,021,351	730	0.07	1,184,344	979	0.08	1,104,613	628	0.06
3	Алматы обл.	4,659,213	5,247	0.11	3,662,898	1,762	0.05	4,216,132	939	0.02
4	Атырау обл.	729,932	2,024	0.28	806,058	1,342	0.17	787,627	897	0.11
5	ШҚО	1,809,134	2,207	0.12	2,035,222	1,620	0.08	1,793,325	1,173	0.07
6	Жамбыл обл.	3,447,971	1,865	0.05	4,109,222	1,235	0.03	4,589,589	911	0.02
7	БҚО	1,383,235	1,347	0.10	1,194,222	1,468	0.12	1,421,832	1,724	0.12
8	Қарағанды обл.	1,134,121	101	0.01	1,312,686	111	0.01	1,307,920	48	0.00
9	Қызылорда обл.	1,135,555	156	0.01	766,506	64	0.01	890,346	141	0.02
10	Қостанай обл.	437,956	72	0.02	431,228	38	0.01	446,413	72	0.02
11	Маңғыстау обл.	401,867	0		563,279			91,077		
12	Павлодар обл.	589,449	53	0.01	614,227	73	0.01	754,266	53	0.01
13	СҚО	521,404	19	0.00	510,123	21	0.00	499,005	10	0.00
14	Түркістан обл.	4,359,074	730	0.02	4,954,124	840	0.02	4,318,438	544	0.01
15	Нұр-Сұлтан қ.	3506		0.00	3412		0.00	2816		0.00
16	Алматы қ.	2255	8	0.35	2234		0.00	1930	4	0.21
17	Шымкент қ.	169,184	7	0.00	140,221	24	0.02	190,300	10	0.01
	барлығы	22,587,669	14,959	0.07	22,805,424	9,657	0.04	23,095,146	7,431	0.03