

**6D120100-Ветеринариялық медицина мамандығы бойынша PhD
философия докторы дәрежесін ізденуге арналған «Мультипротеинді
рекомбинант антигенін бруцеллездің серологиялық балауында қолдану»
тақырыбындағы Іңірбай Бақытқали Қабиұлының
диссертациясына
АҢДАТПА**

Тақырыптың өзектілігі: Қазақстан Республикасы, сонымен қатар бұрынғы Кеңес Одағының басқа да Азия республикалары, бруцеллез ауру бойынша ең жоғарғы елдер қатарына кіреді. 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.

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. 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.

Сиыр мен ешкілердің бруцеллезінің серодиагностикада аталмыш ақуызды нүктелі ИФТ-інде қолдану болашағынан үлкен үміт күттіретін нәтижелер берді. 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. Демек, *Brucella*-ның мультипротеиндері ауру қоздырғышына телімді антиденелерді нақты және тиімді түрде анықтай алатын антиген ретінде бруцеллездің серологиялық диагностикасында қолданыс табуы әбден мүмкін.

Жұмыстың мақсаты: *Brucella* тұқымдасы бактерияларының сыртқы мембранасының рекомбинантты мультипротеиндерін экспрессиялайтын ішек таяқшасының өндіргіш-штамдарын 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 pCMA19, pCMA25 және pCMA31-інің иммунодоминантты аймақтарын анықтау және қоздырғыштың pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+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 малдарының 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.

Зерттеу нысандары: Бруцеллалардың сыртқы мембранасының мультипротеинді рекомбинантты pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+31 ақуыздары, ИҚМ-945 және қойдың-75 сынамасының қан сарысуы.

Зерттеу пәні: Бруцеллалардың сыртқы мембранасынан иммунодоминантты аймақтарынан құрастырлыған мультипротеинді рекомбинантты ақуыздарын алу және олардың иммуногенділігі мен антигенділігін жалқы ақуыздармен салыстыра отырып зерттеу.

Зерттеу әдістері: ветеринариялық, серологиялық, бактериологиялық, генді-инженерлік, статистикалық.

Диссертацияның қорғауға шығарылатын негізгі қағидалары:

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.

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.

Жұмыстың ғылыми-зерттеу бағдарламалармен байланыстылығы

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 №:0118PK00970).

Зерттеу нәтижелері.

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 pCMA19-дың антигенділігі басқаларымен салыстырғанда біршама жоғары болды. Айталық, pCMA19-ға қарсы антиденелер *B. abortus* 544-пен жұқтырылған барлық сиырларда тәжірибенің 14-ші күні жоғары тирлерінде анықталса, ж-ИФТ/pCMA25 нұсқасында оң нәтиже 28-ші күні ғана байқалды, ал бұл мерзімдерде жануарлардың 25%-ында pCMA31-ге қарсы антиденелер мүлдем анықталынбады.

3. Бруцеллалардың минорлы pCMA19 ақуызы Фрейнд адьювантының көмегінсіз-ақ тышқанның телімді антиденелерін түзілуін құрсақ арқылы бір рет енгізгеннің өзінде тудыра алатын иммуногенді антиген.

4. *Brucella*-ның pCMA-дарына қарсы антиденелерді тек ауруға шалдыққан малдар ғана емес, сонымен қатар жұқпаға қарсы екпе алғандар да түзей алды. Мысалы, pCMA19, pCMA25 және pCMA31-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 pCMA19, pCMA25 және pCMA31-інің иммунодоминантты бөлімдері анықталып, жұптастырылған pCMA19+25, pCMA19+31 және pCMA25+31 ақуыздардың гендік-инженерлік конструкцияларының дизайны дайындалды және химерлік құрылымдардың мультиэпитоптарының синтезіне жауапты гендердің нуклеотидтік тізбегі *in*

silico жағдайында жасалынды; pET-28 плазмидасының құрамына гендер клондалынып, *E. coli* BL21 (DE3) жасушаларында ақуыздардың экспрессиясына қол жеткізілді және мақсатты өнімді индукциялаудың оңтайлы параметрлері анықталды.

6. Мультиэпитопты pCMA19+25 және pCMA19+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, pCMA19+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/pCMA19+31 және ж-ИФТ/pCMA19+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%). pCMA19+25 антигенін ж-ИФТ-да қолдану оның дәлдігінің айтарлықтай төмендеуіне әкелді (43%).

9. Қойларды бруцеллезге серологиялық зерттеу кезінде pCMA19+31, басқа екі құрама ақуыздармен салыстырғанда, ж-ИФТ-ге жоғары телімділік бере алды (70%), алайда сыналымның осы нұсқасының сезімталдығы (86%) ИФТ/pCMA19+25 қарағанда (96%) төменірек болды. Дегенмен, pCMA 25+31 қой қан сарысуларын бруцеллезге тексеру кезінде телімділігі бойынша (40%) pCMA19+31-ден біршама төмен болды.

10. Мультиэпитопты ақуыздардың ішінде pCMA19+31-ге негізделген ж-ИФТ мал бруцеллезінің серологиялық диагностикасында қолданыс таба алатын ең қолайлы антиген болып отыр. ж-ИФТ/pCMA19+31 сыналымының коммерциялық ИФТ-жиынтығына (INgezim *Brucella* Compaq 2.0, Spain) қатысты дәлдігі сиырлармен қойларды бруцеллезге зерттеу кезінде тиісінше 92% және 79%-ға тең болды. Әзірленген ИФТ-сыналымы сиыр бруцеллезін балауда *Brucella* LTFLOW (LT Biotech, Литва) ИХТ-імен салыстырғанда дәлірек нәтиже алуға мүмкіндік береді.

Тәжірибелік ұсыныстар. байланысты *E. coli* BL21(DE3)/pET28 pCMA19+31 штаммын ҚР БҒМ ҒК "Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы" РМК-ы тіркеуге алып (№В-РКМ 00913), ҚР №35776 патентімен қорғалды. Аталмыш өндіргіш-штаммды бруцеллезді диагностикалауға арналған иммунологиялық сыналымдарды дайындау кезінде телімді антигенінің көзі ретінде пайдалануға болады.

Тәжірибелік құндылығы.

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 (22.09.2020 жылғы №7 хаттама) және аталмыш жиынтықтың тәжірибелі үлгісі дайындалды.

Қазақстан Республикасында қой бруцеллезі бойынша 2013-2021жж. Арналған эпизоотиялық ахуалының жағдайы. 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 және 6D120100 – "Ветеринариялық медицина" мамандығы докторанттарына "General Immunology" пәндері бойынша дәрістік және зертханалық сабақтарды жүргізуде қолданыс тапты.

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 қарашасы);

- 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 жариялау. Зерттеудің негізгі нәтижелері 11 ғылыми еңбектерде, атап айтсақ 4-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 және Қазақстан республикасының патенті

Диссертацияның көлемі мен құрылымы:

Диссертация компьютерлік мәтінмен 163 бетте мазмұндалған. Диссертация кіріспеден, әдеби шолу, жадығаттар мен әдістер, өзіндік зерттеу нәтижелері, талқылау және қорытындыдан тұрады. Жұмыс 219 әдебиет көздерінен, 5 қосымшадан, 17 кестеден және 26 суреттен тұрады.

АННОТАЦИЯ

**на диссертацию Інірбай Бақытқали Қабиұлы
на тему: «Использование мультипротеинового рекомбинантного антигена
в серологической диагностике бруцеллеза» на соискание степени доктора
философии PhD по специальности 6D120100 - Ветеринарная медицина**

Актуальность темы. Республика Казахстан, как и другие азиатские республики бывшего Советского Союза, входят в число стран с самой высокой заболеваемостью бруцеллезом. Бруцеллез животных зарегистрирован в 1513 (63,4%) из 2383 сельских районов Республики Казахстан. В 2017-2019 годах в нашей стране бруцеллезом диагностировано 111 тысяч голов крупного рогатого скота, а средний показатель заболеваемости составил 0,45%. Заболеваемость бруцеллезом овец за последние годы несколько снизилась и в настоящее время составляет 0,07%. Всего за этот период из-за бруцеллеза было забито около 52 000 овец. Бруцеллез, как зоонозное заболевание, наносит большой экономический ущерб животноводству Республики Казахстан, также угрожает здоровью населения: количество больных бруцеллезом на 100 000 жителей колеблется от 1,9 до 4,9 в зависимости от регионов страны.

Ранняя диагностика животных, зараженных бруцеллезом, является основным звеном в борьбе с болезнью. В настоящее время для этой цели в РК используются традиционные серологические реакции, в частности, реакция роз бенгал пробы (РБП), реакция связывания комплемента (РСК) и реакция агглютинации (РА). В вышеперечисленных серологических реакциях антитела выявляют с помощью антигена, приготовленного из S-формы клеток бруцелл. По этой причине классические серологические реакции, а также коммерческие наборы для ИФА, разработанные на основе липополисахаридного (ЛПС) антигена, могут выявлять антитела, направленные не только к бруцеллам, но и к полисахаридным антигенам других грамотрицательных бактерий, и давать ложные результаты. Например, неудачей закончилось внедрение в ветеринарную практику страны коммерческих наборов ИФА на основе липополисахаридов (S-LPS) гладких штаммов бруцелл (2008-2013 гг.). За этот период поголовье крупного рогатого скота с положительным результатом на бруцеллез увеличилось в 7 раз. Это событие доказало, что ИФА, как один из высокочувствительных методов, может быть использован в серодиагностике бруцеллеза только при наличии антигена, специфичного к возбудителю. Поэтому разработка отечественного ИФА-теста на основе использования антигена, специфичного к возбудителю бруцеллеза, является одной из актуальных проблем ветеринарии не только Республики Казахстан, но и других стран, экономически и социально пострадавших от этой эпидемии.

Гибридный антиген, состоящий из иммунодоминантных эпитопов белков рСМА22, рСМА25 и рСМА31, тестировали для определения его пригодности для серодиагностики бруцеллеза человека. Этот многоэпитопный белок показал хорошую чувствительность и специфичность в исследованиях сывороток крови здоровых людей и пациентов с заболеваниями в ИФА и вестерн-блоттинге. Поэтому вполне возможно, что мультипротеины бруцелл могут быть использованы в серологической диагностике бруцеллеза в качестве антигенов, позволяющих точно и эффективно выявлять антитела к возбудителю.

Цель работы. Получение штаммов-продуцентов *Escherichia coli*, экспрессирующих рекомбинантные мультипротеины наружной мембраны бруцеллезных бактерий, и изучение значения целевых продуктов в серологической диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота в качестве причинных антигенов.

Задачи исследования:

1. Изучение сравнительных иммунологических характеристик и серологического потенциала рекомбинантных внешнемембранных и периплазматических белков бруцелл;

2. Идентификация иммунодоминантных участков pCMA19, pCMA25 и pCMA31 бактерий бруцелл и генно-инженерный дизайн *in silico* генов, ответственных за синтез pCMA19+25, pCMA19+31 и pCMA25+31 химерных (многобелковых) белков возбудителя *Brucella*;

3. Клонирование нуклеотидных последовательностей, синтезированных в плазмиде pET28, и экспрессия мультиэпитопных белков бруцелл pCMA19+25, pCMA19+31 и pCMA25+31 в клетках *E.coli* BL21(DE3) и определение оптимальных параметров для продукции целевых продуктов;

4. Изучение антигенности и иммуногенности рекомбинантных белков бруцелл на лабораторных животных;

5. Сравнение белков бруцелл (pCMA19+25, pCMA19+31 и pCMA25+31) с их собственными белками (pCMA19, pCMA25 и pCMA31) в ИФА с использованием сывороток крови коров и овец с положительными и отрицательными результатами на бруцеллез полученными традиционным серологическим методом определение антигенности;

6. Оценка серологического потенциала ИФА на основе мультипротеиновых рекомбинантных антигенов бруцелл с традиционными методами исследования крупного рогатого скота и овец на бруцеллез.

Объекты исследования: Мультипротеиновые рекомбинантные белки pCMA19+25, pCMA19+31 и pCMA25+31 наружной мембраны бруцелл, сыворотки крови в образцах КРС – 945 и овец – 75.

Предмет исследования: Получение мультипротеиновых рекомбинантных белков, состоящих из иммунодоминантных участков наружной мембраны бруцелл, и изучение их иммуногенности и антигенности в сравнении с собственными белками.

Методы исследования: ветеринарные, серологические, бактериологические, генно-инженерные, статистические.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Синтез мультибелков pCMA19+25, pCMA19+31 и pCMA25+31 в клетках *E.coli* BL21(DE3);

2. Сравнительная антигенность и иммуногенность индивидуальных (pCMA19, pCMA25, pCMA31) и химерных (pCMA19+25, pCMA19+31 и pCMA25+31) белков бруцелл;

3. Определение сравнительной ценности мультипротеиновых рекомбинантных антигенов в ИФА диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота и овец;

4. *E.coli* BL21(DE3)/pET28 pCMA19+31 – штамм-продуцент рекомбинантного белка высокой диагностической ценности бактерий рода *Brucella*.

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что впервые получен прокариотический штамм-продуцент, синтезирующий белок, состоящий из иммунодоминантных фрагментов CMA с молекулярными массами 19 кДа и 31 кДа возбудителя бруцеллеза, и этот антиген был использован при разработке специфичной и чувствительной ИФА для выявления бруцеллеза у животных.

Связь работы с научно-исследовательскими программами

Диссертационная работа была выполнена в рамках научно-технической программы Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан «Разработка новых препаратов и инновационных биотехнологий для сельского хозяйства и ветеринарии» на 2018-2020 годы, по теме проекта «Серологическая диагностика бруцеллеза на основе композитного рекомбинантного антигена» (номер государственной регистрации 0118РК00970).

Результаты исследования.

1. Перспективность использования ИФА на основе рекомбинантных белков, характерных для бруцеллезных бактерий, с целью более точного выявления зараженных коров и овец перед вакцинацией в сложных эпизоотических и эпидемических условиях страны имеет большое будущее.

2. Среди использованных собственных белков бруцелл антигенность pCMA19 оказалась несколько выше, чем у других. Например, антитела против pCMA19 выявлялись в высоких титрах на 14-й день эксперимента у всех коров инфицированных *B. abortus* 544, в то время как положительный результат по варианту ИФА/pCMA25 наблюдался только на 28-й день, в то же время у 25% животных не выявлялись антитела к pCMA31.

3. Минорный белок бруцелл pCMA19 представляет собой иммуногенный антиген, способный индуцировать образование мышинных антител без адьюванта Фрейнда после однократной внутривенной инъекции.

4. Антитела против pCMA бруцелл удалось выработать не только у инфицированных, но и у вакцинированных животных. Так, антитела против pCMA19, pCMA25 и pCMA31 были обнаружены в сыворотках крови более половины (61-64%) здоровых животных, ревакцинированных штаммом *B. abortus* 19 в течение 10 мес после ревакцинации (контрольный срок).

5. Идентифицированы иммунодоминантные части pCMA19, pCMA25 и pCMA31 бактерий бруцелл, разработан дизайн парных белков pCMA19+25, pCMA19+31 и pCMA25+31, определены нуклеотидные последовательности генов, ответственных за синтез мультиэпитопов и были созданы химерные структуры в условиях *in silico*; Гены клонировали в плазмиду pET-28, достигали экспрессии белка в клетках *E. coli* BL21 (DE3) и определяли оптимальные параметры для индукции целевого продукта.

6. После инокуляции мультиэпитопных белков pCMA19+25 и pCMA19+31, с суспензией ТФА затем БФЕ, титры антител в сыворотке мышей составили 1:3940 (+32,0%; -24,2%) и 1:1840 (+52,6%; -34,4%) соответственно в ИФА и проявили свои иммуногенные свойства. Однако pCMA19+31 показал более специфическую антигенность по отношению к бруцеллезным антителам в 19

кроличьих сыворотках к анти - *B. abortus* и был способен взаимодействовать до титра 1:12800.

7. Полиэпитопные белки бруцелл сохраняя свою аутентичность (оригинальность) по сравнению с природными аналогами при экспрессии, очистке и электрофорезе были способны взаимодействовать с антителами в сыворотке крови у телки, экспериментально инфицированной вирулентным штаммом *B. abortus* 544,.

8. Чувствительность образцов ИФА/рСМА19+31 и ИФА/рСМА19+25 полностью подтверждена результатами РБП, полученными при серологических исследованиях бруцеллеза крупного рогатого скота (100%), однако чувствительность второго варианта иммуноанализа был значительно ниже первого (34% и 80% соответственно). Использование антигена рСМА19+25 в ИФА привело к значительному снижению его точности (43%).

9. рСМА19+31 по сравнению с двумя другими комбинированными белками был способен давать более высокую чувствительность (70%) в серологическом исследовании овец на бруцеллез методом ИФА, но чувствительность этой версии теста (86%) была ниже, чем в ИФА/рСМА19+25 (96%). Однако специфичность рСМА 25+31 была немного ниже, чем рСМА19+31 (40%) при тестировании сыворотки овечьей крови на бруцеллез.

10. Среди мультиэпитопных белков ИФА на основе рСМА19+31 является наиболее подходящим антигеном, который можно использовать для серологической диагностики бруцеллеза. Точность теста ИФА рСМА19+31 по сравнению с коммерческим ИФА-набором (INgezim Brucella Compaq 2.0, Испания) составила 92% и 79% соответственно при изучении бруцеллеза коров и овец. Разработанный ИФА-тест позволяет получить более точные результаты по сравнению с ИХТ *Brucella LTFLOW* (LT Biotech, Литва) при бруцеллезе крупного рогатого скота.

Практические предложения. Штамм *E. coli* BL21(DE3)/pET28 рСМА19+31 зарегистрирован РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК (№Б-РКМ 00913), защищен патентом РК № 35776. можно использовать как источник. Данный штамм-продуцент можно использовать в качестве источника антигена при подготовке иммунологических тестов для диагностики бруцеллеза.

Практическая ценность.

Лабораторный регламент по приготовлению и применению «Набора ИФА для диагностики бруцеллеза», разработанного на основе рекомбинантного белка, утвержден на заседании научно-технической комиссии «Казахский аграрный технический университет имени С.Сейфуллина» КАО (КазАТУ) (протокол № 7 от 22.09.2020). Приготовлен экспериментальный образец.

2013-2021 гг. по бруцеллезу овец в Республике Казахстан специфическая эпизоотическая ситуация. Основные результаты диссертации вошли в раздел «Новые методы диагностики бруцеллеза» учебника «Современные проблемы биотехнологии в ветеринарии и животноводстве» для аспирантов КазАТУ по специальности 6М070100 «Биотехнология» и для докторантов КазАТУ по специальности 6D120100 «Ветеринария». Использовалась при проведении лекционных и лабораторных занятий по дисциплине «Общая иммунология».

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на следующих международных конференциях:

- «Сейфуллинские чтения – 15: Молодежь, наука, технологии – новые идеи и перспективы», посвященные 125-летию со дня рождения С.Сейфуллина (19 ноября 2019 г.);

- конференция: Наука, производство, бизнес: современное состояние и пути инновационного развития аграрного сектора на примере агрохолдинга «Байсерке-Агро» посвященная 70-летию Т.М. Досмухамбетова, заслуженного деятеля Республики Казахстан (4-5 апреля 2019 г.);

- «Актуальные проблемы и направления развития современной сельскохозяйственной науки и ветеринарии», посвященная памяти профессора В. И. Пионтковского (18 июня 2021 г.).

Кроме того, основные результаты работы были представлены на «Первом Китайско-Казахстанском научно-техническом форуме последипломного образования в области ветеринарной медицины [The first China-Kazakhstan Veterinary Medicine Science and Technology Postgraduate Academic Forum] (28 мая 2022 г.).

Публикация результатов исследований. Основные результаты исследования изложены в 11 научных работах, а именно 4 в изданиях, рекомендованных Комитетом науки МОН РК, 3 в журналах, входящих в базу данных Scopus (Ветеринарный мир - 2 и Турецкий журнал ветеринарии и зоотехники - 1), в материалах республиканских и международных конференции 1 и 3 статьи соответственно, также имеется патент РК

Объем и структура диссертации:

Диссертация содержит 163 страницы компьютерного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методов, результатов собственного исследования, обсуждения и заключения. Работа содержит 219 литературных источников, 5 приложений, 17 таблиц и 26 рисунков.

ANNOTATION

For the dissertation work of Ingirbay Bakytkali on the topic « Using multiprotein recombinant antigen for serological diagnosis of brucellosis», for the degree of Doctor of Philosophy Ph.D. in the specialty 6D120100-Veterinary Medicine

Relevance of the research work. The Republic of Kazakhstan is among the countries like other Asian countries of the former Soviet Union, with the highest incidence of brucellosis. 1513 (63.4%) livestock brucellosis were identified out of 2383 rural areas of the Republic of Kazakhstan. In 2017-2019, 111 thousand heads of cattle were diagnosed with brucellosis in our country, and the average incidence rate was 0.45%. The incidence of brucellosis in sheep has slightly decreased in recent years and currently stands at 0.07%. In total, about 52,000 sheep were died due to brucellosis during this period. Brucellosis, as a zoonotic disease, causes great economic damage to the livestock industry of Kazakhstan, and also threatens public health: the number of patients with brucellosis per 100,000 inhabitants ranges from 1.9 to 4.9, depending on the regions of the country. Early diagnosis of animals infected with brucellosis is the main task to fight against the disease. Currently, for this purpose, traditional serological tests have been used in Kazakhstan, in particular, The Rose Bengal test (RBT), The Complement Fixation Test (CFT) and the Agglutination Test (AT). In the above serological tests, antibodies are detected using an antigen prepared from the S-form of Brucella cells. For this reason, classical serological tests, as well as commercial ELISA kits developed based on the lipopolysaccharide (LPS) antigen, can detect antibodies not only to Brucella, but also to polysaccharide antigens of other gram-negative bacteria, and may give false results. In 2008-2013, the attempt of developing commercial ELISA kits based on lipopolysaccharides (S-LPS) of some strains of Brucella into the veterinary practice of Kazakhstan ended in failure.

During this period of time, the number of cattle with a positive result for brucellosis increased by 7 times. This event proved that ELISA, as one of the highly sensitive methods, can be used in the serodiagnosis of brucellosis only in the presence of an antigen specific to the pathogen. Therefore, the development of a domestic ELISA test based on the use of an antigen specific to the causative antigen of brucellosis is one of the urgent problems of veterinary medicine not only in Kazakhstan, but also in other countries that have been economically and socially affected by this epidemic.

A hybrid antigen consisting of immunodominant epitopes of pCMA22, pCMA25 and pCMA31 proteins was tested to determine its suitability for serodiagnosis of human brucellosis. This multi-epitope protein has shown good sensitivity and specificity in ELISA and Western blotting on brucellosis positive and negative human blood serum. Therefore, it is quite possible that Brucella multiproteins can be used in the serological diagnosis of brucellosis as antigens that allow for accurate and efficient detection of antibodies to the pathogen.

The purpose of the research work. Obtaining strains of Escherichia coli expressing recombinant multiproteins of the outer membrane of brucellosis bacteria, and studying the significance of target products in the serological diagnosis of brucellosis in bovine as causative antigens.

Research objectives:

1. Studying immunological characteristics and serological potential of recombinant outer membrane and periplasmic proteins of Brucella;
2. Identification of immunodominant regions of pCMA19, pCMA25 and pCMA31 of Brucella bacteria and genetic engineering design in silico of the genes responsible for the synthesis of pCMA19+25, pCMA19+31 and pCMA25+31 chimeric (multiprotein) proteins of the pathogen Brucella;
3. Cloning of nucleotide sequences synthesized in the pET28 plasmid and expression of Brucella multi-epitope proteins pCMA19+25, pCMA19+31 and pCMA25+31 in E. coli BL21(DE3) cells and determination of optimal parameters for the production of target products;
4. Study of antigenicity and immunogenicity of recombinant Brucella proteins in laboratory animals;
5. Comparison of Brucella proteins (pCMA19+25, pCMA19+31 and pCMA25+31) with the wild type native proteins (pCMA19, pCMA25 and pCMA31) in ELISA using blood serum from cattle and sheep with positive and negative controls for brucellosis obtained by the traditional serological method for determining antigenicity;
6. Evaluation of the serological potential of ELISA based on recombinant multi-epitop protein of Brucella antigens with traditional methods for testing cattle and sheep for brucellosis.

Objects of the study: Recombinant multi-epitope proteins pCMA19+25, pCMA19+31 and pCMA25+31 of the outer membrane of Brucella, blood serum in bovine samples - 945 and sheep - 75.

Subjects of the study: Obtaining recombinant multi-epitope proteins consisting of immunodominant regions of the outer membrane of Brucella, and studying their immunogenicity and antigenicity in comparison with their native proteins.

Research methods: veterinary, serological, bacteriological, genetic engineering, statistical.

The main provisions of the dissertation submitted for defense:

1. Synthesis of multiproteins pCMA19+25, pCMA19+31 and pCMA25+31 in E. coli BL21(DE3) cells;
2. Comparative antigenicity and immunogenicity of individual (pCMA19, pCMA25, pCMA31) and chimeric (pCMA19+25, pCMA19+31 and pCMA25+31) Brucella proteins;
3. Determination of the comparative value of multiprotein recombinant antigens in ELISA for the diagnosis of brucellosis in cattle and sheep;
4. E.coli BL21(DE3)/pET28 pCMA19+31 is recombinant protein producing of high diagnostic value of bacteria of Brucella.

The scientific novelty of the dissertation work in this study, for the first time obtained prokaryotic producer strain synthesizing a protein consisting of immunodominant CMA fragments with molecular masses of 19 kDa and 31 kDa of the causative agent of brucellosis was obtained, and this antigen was used in the development of a specific and sensitive ELISA for the detection of brucellosis in animals.

Relationship of scientific work with research programs

The dissertation work was carried out within the framework of the scientific and technical program of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan "Development of new drugs and innovative biotechnologies for agriculture and veterinary medicine" for 2018-2020, on the topic of the project "Serological diagnosis of brucellosis based on a composite recombinant antigen" (number of the state registration 0118RK00970).

Results of the study.

1. The prospect of using ELISA based on recombinant proteins characteristic of brucellosis bacteria has a great future in order to more accurately identify infected cattles and sheeps before vaccination in difficult epizootic and epidemic conditions of the country.

2. Among the used *Brucella* intrinsic proteins, the antigenicity of pCMA19 was somewhat higher than that of the others. For example, antibodies against pCMA19 were detected in high titers on the 14th day of the experiment in all cattles infected with *B. abortus* 544, while a positive result for the ELISA/pCMA25 variant was observed only on the 28th day, at the same time in 25% animals did not detect antibodies to pCMA31.

3. The *Brucella* minor protein pCMA19 is an immunogenic antigen capable of inducing the formation of mouse antibodies without Freund's adjuvant after a single intraperitoneal injection.

4. Antibodies against brucella pCMA have been developed not only in infected but also in vaccinated animals. Thus, antibodies against pCMA19, pCMA25, and pCMA31 were detected in the blood serum of more than 50% (61–64%) of healthy animals revaccinated with *B. abortus* 19 within 10 months after revaccination (control period).

5. The immunodominant region of pCMA19, pCMA25, and pCMA31 of *Brucella* bacteria were identified, the design of paired proteins pCMA19+25, pCMA19+31, and pCMA25+31 was developed, the nucleotide sequences of the genes responsible for the synthesis of multiepitopes were determined, and chimeric structures were created under in silico conditions; The genes were cloned into the pET-28 plasmid, protein expression was achieved in *E. coli* BL21 (DE3) cells, and the optimal parameters for the induction of the target product were determined.

6. After inoculation of the multiepitope proteins pCMA19+25 and pCMA19+31, with a suspension of TFA followed by BPE, antibody titers in mouse serum were 1:3940 (+32.0%; -24.2%) and 1:1840 (+52.6% ; -34.4%), respectively, in ELISA and showed their immunogenic properties. However, pCMA19+31 showed more specific antigenicity for *Brucella* antibodies in 19 rabbit serum against anti-*B. abortus* and was able to interact up to a titer of 1:12800.

7. *Brucella* polyepitope protein preserved its authenticity (original structure) in comparison with natural analogues, during expression, purification and electrophoresis and were able to interact with antibodies in the blood serum of a cow which is experimentally infected with the virulent strain *B. abortus* 544.

8. The sensitivity of the ELISA/pCMA19+31 and ELISA/pCMA19+25 samples was fully confirmed by the RBP results that obtained in serological studies of bovine brucellosis (100%), however, the sensitivity of the second immunoassay was

significantly lower than the first (34% and 80%, respectively). The use of the pCMA19+25 antigen in ELISA led to a significant decrease in its accuracy (43%).

9. pCMA19+31 compared to the other two combination proteins was able to give higher sensitivity (70%) in bovine serological testing for brucellosis by ELISA, but the sensitivity of this version of the test (86%) was lower than in ELISA/pCMA19+25 (96 %). However, the specificity of pCMA 25+31 was slightly lower than pCMA19+31 (40%) when testing sheep blood serum for brucellosis.

10. Among multiepitope proteins, pCMA19+31-based ELISA is the most suitable antigen that can be used for the serological diagnosis of brucellosis. The accuracy of the ELISA pCMA19+31 test compared to the commercial ELISA kit (INgezim Brucella Compaq 2.0, Spain) was 92% and 79%, respectively, in the study of brucellosis in bovine and sheep. The developed ELISA test kit makes it possible to obtain more accurate results compared to ICT Brucella LTFLOW (LT Biotech, Lithuania) in bovine brucellosis.

Practical suggestions. The E. coli strain BL21(DE3)/pET28 pCMA19+31 was registered by the RSE “Republican Collection of Microorganisms” KN MES RK (No. B-RKM 00913), and protected by the RK patent No. 35776. can be used as a source. This producer strain can be used as a source of antigen in the preparation of immunological tests for the diagnosis of brucellosis.

Practical value. The laboratory regulations for the preparation and use of the "ELISA kit for the diagnosis of brucellosis", was developed on the basis of recombinant protein approved at a meeting of the scientific and technical commission "Kazakh Agrarian Technical University named after S. Seifullin" KAO (KazATU) (protocol No. 7 from 22.09.2020). An experimental sample has been prepared.

In 2013-2021 in Kazakhstan brucellosis in sheep was a specific epizootic situation. The main results of the dissertation were included in the section "New methods for diagnosing brucellosis" of the textbook "Modern problems of biotechnology in veterinary medicine and animal husbandry" for graduate students of KazATU in the specialty 6M070100 "Biotechnology" and for doctoral students of KazATU in the specialty 6D120100 "Veterinary". It was used during lectures and laboratory classes in the discipline "General Immunology".

Approbation of research work. The research results were presented at the following international conferences:

- «Сейфуллинские чтения – 15: Молодежь, наука, технологии – новые идеи и перспективы», посвященные 125-летию со дня рождения С.Сейфуллина (19 ноября 2019 г.);

- конференция: Наука, производство, бизнес: современное состояние и пути инновационного развития аграрного сектора на примере агрохолдинга «Байсерке-Агро» посвященная 70-летию Т.М. Досмухамбетова, заслуженного деятеля Республики Казахстан (4-5 апреля 2019 г.);

- «Актуальные проблемы и направления развития современной сельскохозяйственной науки и ветеринарии», посвященная памяти профессора В. И. Пионтковского (18 июня 2021 г.).

In addition, the main result of the study was presented at the [The first China-Kazakhstan Veterinary Medicine Science and Technology Postgraduate Academic Forum] (May 28. 2022).

Publication of research results. The main results of the study were presented in 11 scientific papers, namely 4 in publications recommended by the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, 3 in journals that included in the Scopus database (Veterinary World - 2 and the Turkish Journal of Veterinary Medicine and Animal Science - 1), 1 article was published in domestic conference and 3 articles were published in international conference materials and were patented in Kazakhstan.

The scope and structure of the dissertation:

The dissertation contains 163 pages of computer text. Which consists of an introduction, literature review, methods, results of own research, discussion and conclusion. The dissertation contains 219 references, 5 appendices, 17 tables and 26 figures.