

THE ANTIGENICITY OF THE OUTER MEMBRANE PROTEINS OF BRUCELLA

Bulashev A.K., Suranshiev Zh.A., Zhumalin A.Kh., Tursunov K.A.

S. Seifullin Kazakh Agro-Technical University
2 Altynsarin Str., Astana, 010011, Kazakhstan
kanat_tka@mail.ru

ABSTRACT

The effectiveness of brucellosis eradication measures depends on the timely diagnosis and isolation of infected animals. Commercial ELISA-kits for diagnosis of brucellosis use lipopolysaccharides (LPS) as target antigens. It is well known that use of these cell wall components can result in false-positive results due to cross-reaction of antibodies against *Brucella* spp. with other gram-negative bacteria. Outer membrane proteins (OMP) are of great interest, as they are specific, not only to the *Brucella* genus, but also for particular species. OMP extracted from *Brucella abortus* 19 and *Brucella melitensis* Rev-1 were more antigenic than LPS by agglutination and complement fixation tests using serum samples from cows positive for brucellosis. *B. abortus* OMP also had significantly greater diagnostic value than an antigenic recombinant protein with a molecular weight of 26 kDa (*rBP26*). A noticeable advantage of OMP over *rBP26* was also established by serological investigation of cows vaccinated with the rough strain, *B. abortus* RB-51. The results suggest that in the development of ELISA-kits for diagnosis of bovine brucellosis not a single protein, but several recombinant proteins, with distinct antigenic properties should be used. Among OMP protein fractions from both *Brucella* species, those with the greatest potential as diagnostic antigens had molecular weights of 19 and 15 kDa, in addition to a *B. melitensis* protein, with a molecular weight of 12 kDa. These proteins demonstrated antigenicity in western blot analysis using serum antibodies from cows positive for brucellosis by serological tests and PCR.

Keywords: brucellosis, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, outer membrane proteins, antigenicity, ELISA.

УДК619:616.9 (045)

АНТИГЕННОСТЬ БЕЛКОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ БРУЦЕЛЛ

Булашев А.К., Сураншиев Ж.А., Жумалин А.Х., Турсунов К.А.

Научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии
ул. Ы. Алтынсарина, 2, Астана, 010011, Казахстан
kanat_tka@mail.ru

АБСТРАКТ

Эффективность мероприятий по искоренению бруцеллеза зависит от своевременной диагностики и изоляции больных животных. В коммерческих ИФА-наборах для диагностики бруцеллеза в качестве антигена используются липополисахариды (ЛПС). Общеизвестно, что именно эти компоненты клетки обуславливают перекрестные реакции между бруцеллами и многими грамотрицательными бактериями. В этой связи большой интерес представляют белки внешней мембраны (БВМ), которые определяют не только родовую, но и видовую специфичность бруцелл. Установлено, что БВМ, выделенные из *Brucella abortus* 19 и *Brucella melitensis* Rev-1, обладают более выраженной антигенностью по сравнению с ЛПС при использовании сывороток крови коров, положительно реагирующих на бруцеллез по результатам РА и РСК. БВМ существенно превосходили по своей диагностической ценности и рекомбинантный белок *B. abortus* с молекулярной массой 26 кД (*rBP26*). Заметное преимущество БВМ перед *rBP26* было установлено и при серологических исследованиях коров, привитых вакциной из шероховатого штамма *B. abortus* RB-51. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при разработке иммуноферментных тест-систем для диагностики бруцеллеза необходимо использовать не один, а несколько рекомбинантных белков, обладающих выраженными антигенными свойствами. Наибольшую перспективность в качестве диагностически важного антигена среди фракций БВМ обоих видов бруцелл имеют белки с мол.м. 19 кД и 15 кД, а также белок *Brucella melitensis* с мол.м 12 кД, которые в иммуноблоттинге показали антигенность по отношению к антителам сывороток крови коров, положительно реагирующих на бруцеллез по результатам серологических тестов и ПЦР.

Ключевые слова: бруцеллез, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, белки внешней мембраны, антигенность, ИФА.

ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотическая обстановка по бруцеллезу в Казахстане остается напряженной. Высокая заболеваемость животных зарегистрирована в Акмолинской, Карагандинской и Западно-Казахстанской областях (2,45-2,77%), а в Атырауской, Кустанайской и Павлодарской областях инфицированность скота близка к среднему показателю по республике (1,05-1,13%) [1]. Неблагополучные пункты по бруцеллезу мелкого рогатого скота сосредоточены в регионах Алматинской, Южно-Казахстанской, Жамбылской, Кызылординской и Восточно-Казахстанской областях. Среди стран СНГ Казахстан занимает второе место после Киргизии по заболеваемости людей бруцеллезом. В последние годы в стране регистрируется ежегодно 2500-3500 случаев заболевания людей. Для сравнения: в России с населением в десять раз больше, чем в Казахстане, зарегистрировано всего 300-400 случаев заболевания бруцеллезом [2].

Эффективность борьбы с бруцеллезом зависит от своевременной диагностики и изоляции больных животных. В нашей стране и за рубежом в серологической диагностике бруцеллеза используются такие тесты как РА, РБП, РСК, КР, РИФ и др. В последнее время в диагностической практике находят свое применение ИФА тест-системы. Возрастающая популярность последних объясняется высокой чувствительностью и возможностью автоматизации этапов его постановки [3]. Однако специфичность ИФА в полной мере зависит от природы используемого антигена возбудителя. В коммерческих ИФА-наборах для серологической диагностики бруцеллеза в качестве антигена, как правило, используются ЛПС [4]. Общеизвестно, что именно эти компоненты клетки обуславливают перекрестные реакции между бруцеллами и многими грамотрицательными бактериями [5-7]. Тем не менее, производители диагностикомов отдают предпочтение полисахаридным компонентам из-за легкости их получения. Неслучайно, с внедрением ИФА в практику диагностики Казахстана количество животных, положительно реагирующих на бруцеллез, резко возросло, однако улучшение эпизоотической ситуации не наступало. В период использования ИФА в нашей стране, на наш взгляд, имела место необоснованная выбраковка большого количества здоровых животных, признанных серопозитивными из-за использования ЛПС в таком высокочувствительном тесте как ИФА. Причиной ложноположительных реакций в первые годы внедрения данного теста могли быть не только перекрестно реагирующие антитела, но и поствакцинальные антитела. Учитывая сложившуюся ситуацию, МСХ РК было принято решение вновь использовать классические реакции для серологической диагностики бруцеллеза и возобновить вакцинацию животных. ИФА, как высокочувствительный тест, рекомендован для исследования невакцинированного молодняка. Однако, и в данном случае, использование в ИФА менее специфичного для возбудителя бруцеллеза антигена также может привести к неоправданному убою молодняка крупного рогатого скота из-за естественного контакта животных с микроорганизмами, имеющими сходные детерминанты с бруцеллами в составе ЛПС. В этой связи поиск более специфичных для бруцелл антигенов и разработка новой тест-системы ИФА остается весьма важной проблемой ветеринарной науки и практики Казахстана. Большой интерес представляют белковые антигены бруцелл, которые определяют не только родовую, но и видовую специфичность бруцелл [8-10].

Целью настоящей работы явилось выделение белков внешней мембраны (БВМ) *Brucella abortus* и *Brucella melitensis* и изучение их антигенных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление питательной среды. В 1000,0 мл горячей дистиллированной воды добавляли 10,0 г агар-агара и перемешивали до полного растворения. После чего добавляли 36,0 г мясопептонного агара (Applichem, Германия), 5 г пептона (Applichem, Германия), 2 мг глицерина (Реахим, Россия), 10,0 г глюкозы (Sigma, США), 0,06 г эритрола (Sigma, США), 0,315 г L-цистеина (Sigma, США) и 0,195 мл дрожжевого экстракта (Applichem, Германия). Смесь доводили до кипения, а затем питательную среду разливали в бактериологические пробирки и колбы Тартаковского, стерилизовали при 1,0 атм. в течение 30 минут.

Наработка бактериальной массы штаммов культуры *B.abortus* 19 и *B.melitensis* Rev-1. Двухсуточную культуру обоих штаммов смывали с косога агара физиологическим раствором и засеивали в колбу Тартаковского с питательной средой. Через 24 часа после посева поверхность агара повторно увлажняли физиологическим раствором для лучшего роста. Через 48 часов выращенную культуру проверяли на стерильность и типичность роста. Культуру бруцелл смывали 0,5% карбонизированным физиологическим раствором и освобождали от возможных примесей питательной среды путем фильтрации через 3-слойный марлевый фильтр с ватой. Для инактивации бруцелл флаконы выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 48 часов. Затем взвесь микроорганизмов трижды отмывали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 мин. Нарботанная бактериальная масса была использована для выделения БВМ из клеточной стенки бруцелл.

Получение БВМ бруцелл осуществляли по методике, описанной К.Т. Шенжановым и соавт. (2002) [11], которая основана на элюировании БВМ из клеток бруцелл 0,1М раствором цитрата натрия, содержащий 1М хлорида натрия и 0,1% тритон X-100. Содержание белка определялось по общеизвестной методике [12].

Антигены. Рекомбинантный белок *rBP26* и ЛПС *B.abortus* были любезно предоставлены ведущим научным сотрудником лаборатории клеточной технологии Национального центра биотехнологии Комитета

науки МОН РК, к.в.н. С.З. Ескендировой. В качестве единого бруцеллезного антигена (ЕБА) использовали биофабричный препарат производства НПП «Антиген», Казахстан.

Сыворотки. Образцы сывороток крови крупного рогатого скота, положительно реагирующих на бруцеллез по результатам РА и РСК, сыворотки крови коров, привитых вакциной из штамма *B.abortus RB-51*, а также сыворотка крови коровы, показавшей положительные результаты на бруцеллез по серологическим тестам и ПЦР, были получены от РГП «Республиканская ветеринарная лаборатория».

Электрофорез БВМ бруцелл. Электрофорез проводили в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) по общеизвестной методике [13] на аппарате для вертикального электрофореза (Bio-Rad, США). Молекулярную массу БВМ определяли с помощью программного обеспечения Photo-CaptVersion 12.4 компании "VILBER LOURMAT".

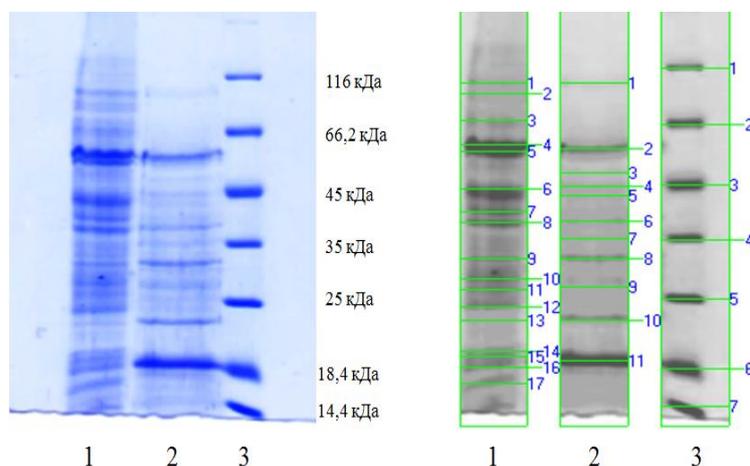
Постановка иммуноблоттинга. Электрофоретический перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану и проявление специфических белковых полос с помощью сывороток крови коров, положительно реагирующих на бруцеллез, осуществляли по общепринятой методике [14].

Антигенность БВМ бруцелл в ИФА определяли в ИФА с использованием сывороток крови коров, положительно реагирующих на бруцеллез по результатам классических серологических реакций (РА, РБП и РСК) иммунизированных вакциной из штамма *B.abortus BR51*. Вкратце, в лунки полистиролового планшета для ИФА вносили 0,1 мл антигенов бруцелл (БВМ, ЛПС, гВР26, ЕБА) в концентрации 10 мкг/мл в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с pH 7,4. Для адсорбции антигена планшет выдерживали при 4°C в течение 18 часов. Затем содержимое лунок удаляли и отмывали их трехкратно ЗФР с твином (ЗФР-Тв). Далее в лунках готовили разведения исследуемой, а также контрольных (положительных и отрицательных) сывороток в ЗФР-Тв, начиная с титра 1:100, и инкубировали 1 час в термостате при 37°C. После отмывки планшеты в лунки вносили рабочее разведение антивидового конъюгата в ЗФР-Тв. Через 1 час несвязанный конъюгат удаляли отмыванием и в лунки вносили раствор субстрата фермента, представляющий собой раствор тетраметилбензидина и перекиси водорода. Планшет закрывали крышкой и оставляли в темном месте при комнатной температуре. Спустя 3-5 мин в лунки добавляли равное количество 2М серной кислоты. Результаты ИФА учитывали спектрофотометрически при длине волны 492 нм. Реакцию считали положительной, если показатель оптической плотности (ОП) исследуемой сыворотки в два и более раз превышал максимальное значение экстинкции отрицательного контроля.

Результаты серологических исследований подвергались статистической обработке для определения достоверности различий между титрами антител сывороток крови [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты электрофореза БВМ, полученных из двух видов бруцелл, в ПААГ-ДСН показаны на рисунке 1.



1 – БВМ *B. melitensis Rev-1*; 2 – БВМ *B. abortus 19*; 3 – маркерные белки

Рис. 1. Электрофореграмма БВМ *B. melitensis Rev-1* и *B. abortus 19*

1 – Outer membrane protein of *B. melitensis Rev-1*; 2 – Outer membrane protein of *B. abortus 19*; 3 – marker proteins

Fig. 1. Electrophoregram of the outer membrane proteins of *B. melitensis, Rev-1* and *B. abortus, 19*

Анализ электрофореграммы БВМ *Brucellamelitensis Rev-1* показал наличие 17 белковых полос с молекулярной массой (мол.м.) от 16,5 кД до 101,1 кД, среди которых мажорными оказались пять фракций с мол.м.: 58,2 кД; 55,7 кД; 44,3 кД; 40,1 кД, и 31,5 кД. В составе БВМ *B. abortus 19* обнаружены 11 белков, мол.м.

которых находились в пределах от 18,8кД до 101.1кД. Пять мажорных полос имели мол.м: 56,7 кД; 38,4 кД, 31,5 кД; 22,5 кД и 18,8кД.

Из рисунка 1 следует, что среди мажорных белков наиболее представительными у обоих видов бруцелл являются полосы, мол.м. которых лежат в диапазоне от 55,7-58,2кД. Кроме того, у БВМ *B.abortus* 19 белок с мол.м. 18,8 кД образовал одну ярко выраженную полосу, тогда как в районе этого белка у *Brucella melitensis* Rev-1 выявлены три минорные фракции с мол.м.: 19,1 кД; 18,1 кД и 16,5 кД.

Антигенность выделенных препаратов БВМ *B.abortus* и *B.melitensis* была испытана в непрямом ИФА на образцах сывороток крови 49 коров, положительно реагирующих на бруцеллез по РА и РСК (таблица 1).

Таблица 1. Результаты ИФА коров с позитивной реакцией на бруцеллез по классическим серологическим тестам

Table 1. ELISA results from cows with a positive response to brucellosis by classic serological testing

Антиген Antigen	Показатель ИФА (n=49 гол.) Indicator of the ELISA (n=49 heads)		Достоверность различий The significance of differences		
	Титр антител сыворотки The titer of serum antibodies	ОП реакционной жидкости The OD of the reaction liquid	Между показателями ОП Between the optical density	t	P
ЛПС <i>B.abortus</i>	1:610 (+26,6%; -21,1%)	0,189±0,002	ЛПС-БВМ <i>B. abortus</i> 19	0,89	>0,11
БВМ <i>B.abortus</i> 19	1:2 110 (+10,2%; -9,3%)	0,192±0,004	ЛПС-БВМ <i>B. melitensis</i> Rev-1	22,0	<0,001
БВМ <i>B.melitensis</i> Rev-1	1:4220 (+14,1%; -12,3%)	0,299±0,005	БВМ <i>B. abortus</i> 19- БВМ <i>B. melitensis</i> Rev-1	17,7	<0,001
<i>rBP26</i>	1:130 (+30,0%; -12,2%)	0,129±0,029	БВМ <i>B. abortus</i> 19- <i>rBP26</i>	2,17	<0,05
			БВМ <i>B. melitensis</i> Rev-1- <i>rBP26</i>	5,86	<0,001
Примечание – ОП реакционной жидкости представляет средние значения показателей первых четырех лунок, в которых образцы сывороток крови разводились от 1:100 до 1:800.					
Note – The optical density readings from reaction liquids represents average values from the first four wells in which serum samples were serially diluted from 1:100 to 1:800.					

Сывороточные антитела всех серопозитивных животных более активно связывались с БВМ *Brucella*, чем с его ЛПС, что свидетельствует о сравнительно высокой антигенности приготовленных белковых препаратов. Так, в сыворотке крови серопозитивных животных средний титр антител против ЛПС находился в пределах 1:610 (+26,6%; -21,1%), тогда как антитела, связывающиеся с БВМ *B.abortus* 19 и *B.melitensis* Rev-1, обнаруживались до разведения сыворотки крови 1:2110 (t=4,76; P<0,001) и 1:4220 (t=6,67; P<0,001), соответственно.

Существенные различия установлены и между титрами антител против БВМ и антигена *rBP26*. Например, антитела серопозитивных животных наиболее активно связывались с БВМ *B.abortus* 19 (t=6,19; P<0,001) и *B.melitensis* Rev-1 (t=7,5; P<0,001), чем с рекомбинантным антигеном. Аналогичные различия были зарегистрированы и по показателям ОП лунок, сенсibilизированных упомянутыми антигенами. Следует подчеркнуть, что у 4 гол. или 8,2% поголовья при использовании *rBP26* получен отрицательный результат в ИФА. Кроме того, рекомбинантный антиген уступал по своей антигенности ЛПС (t=3,15; P<0,05).

Средняя ОП реакционной жидкости лунок, сенсibilизированных ЛПС, была существенно ниже, чем показатели экстинции лунок, покрытых БВМ *B.melitensis* (P<0,001). Кроме того, белки этого вида бруцелл оказались более антигенными, чем БВМ *B.abortus* (P<0,001). По средним показателям ОП реакционной жидкости лунки, покрытые ЛПС и БВМ *B.abortus*, существенно не отличались между собой, хотя положительный результат был более четко выражен при использовании последнего антигена. Например, при тестировании сывороток крови серопозитивных животных в ИФА средняя ОП лунок с ЛПС превышала показатель экстинции контрольной лунки в 2,73 раза (0,189 и 0,69, соответственно), а в случае использования БВМ *B.abortus* 19 это превосходство было более существенным – в 10,1 раза (0,192 и 0,19, соответственно).

Антигенность БВМ *B.abortus 19* и *B.melitensis Rev-1* была изучена и на образцах сыворотки крови, полученных от коров через 14 дней после прививки вакциной из штамма *B.abortus RB-51*. Эта вакцина изготавливается на основе шероховатого R-штамма бруцелл, лишенной O-цепи ЛПС. По инструкции изготовителя она не вызывает образования S-антител, и поэтому при использовании классических серологических тестов позволяет дифференцировать больных от вакцинированных животных (таблица 2).

Таблица 2. Сравнение антигенности препаратов бруцелл в ИФА при исследованиях коров, иммунизированных против бруцеллеза вакциной из штамма *B. abortus RB-51*

Table 2. Comparison of the antigenicity of *Brucella spp.* preparations by ELISA of samples from cows immunised against brucellosis with a *B. abortus RB-51* strain vaccine.

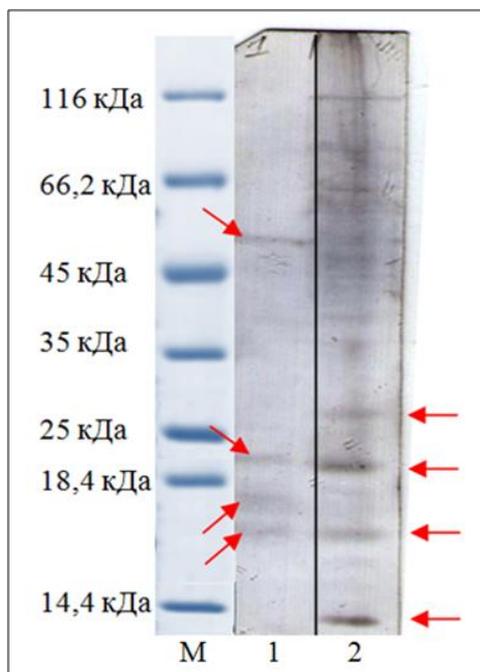
Номер животных Number of animals	Титр противобруцеллезных антител в ИФА против: The titer of antibrucellar antibodies in ELISA against:					Результаты РБП Results of the Rose bengal test
	БВМ (Omp) <i>B. abortus 19</i>	БВМ (Omp) <i>B. melitensis REV-1</i>	ЕБА General brucellosis antigen	ЛПС LPS	<i>rBP26</i>	
1	1:200	PO	PO	PO	PO	-
2	PO	1:100	PO	PO	PO	-
3	PO	PO	PO	1:100	PO	-
4	1:100	1:100	1:100	PO	PO	-
5	PO	PO	1:100	PO	PO	-
6	PO	PO	PO	PO	1:100	-
7	1:400	1:200	1:400	PO	PO	+ (-)
8	1:100	1:6 400	PO	PO	PO	+
9	1:200	1:800	1:100	PO	PO	+
10	1:200	1:400	PO	PO	1:100	+
11	PO	PO	PO	PO	PO	-
12	PO	1:1 600	PO	PO	PO	+
13	1:200	PO	PO	PO	PO	-
14	1:100	1:200	PO	1:100	PO	-
15	PO	PO	PO	PO	PO	-
16	PO	PO	PO	PO	PO	-
17	1:200	PO	PO	PO	1:100	-
18	PO	PO	PO	PO	1:100	-
19	1:200	1:100	PO	PO	1:100	+ (-)
20	1:200	1:200	PO	1:100	1:100	+ (-)
21	1:200	1:1 600	PO	PO	PO	+
22	1:100	PO	PO	PO	PO	-
23	1:200	PO	1:100	PO	1:100	-
24	PO	PO	1:200	PO	1:100	-
25	PO	PO	1:100	1:100	1:100	-

Примечания: PO – реакция отрицательная; + (-) – сомнительная реакция.
Notes: PO – negative reaction; + (-) – dubious reaction.

Из таблицы 2 видно, что антитела против БВМ *B.abortus 19* и *B.melitensis Rev-1* обнаруживались у 14 гол.(56%) и 11 гол.(44%), соответственно. Сравнимые показатели находились между собой в тесной корреляционной связи ($r=0,80$). На рекомбинантный антиген положительную реакцию показали 9 гол.или 36%

поголовья. Между БВМ бруцелл *irBP26* антигеном была установлена корреляционная связь средней степени ($r=0,51$). Результаты серологических реакций, предназначенные для выявления S-антител (ИФА с ЛПС или ЕБА и РБП), находились между собой в слабой корреляционной связи.

Антигенность отдельных фракций БВМ бруцелл в иммуноблоттинге по отношению к антителам сыворотки крови коровы №78, положительно реагирующей на бруцеллез по результатам РА, РСК и ИФА, показана на рисунке 2.



М – маркерные белки; 1 – *B. abortus* 19; 2 – *B. melitensis* Rev-1

Рис. 2. Иммуноблоттинг БВМ бруцелл

М – marker proteins; 1 – *B. abortus* 19; 2 – *B. melitensis* Rev-1.

Fig. 2. Immunoblotting of the outer membrane proteins of *Brucella* spp.

Как видно из рисунка 2, среди фракций БВМ *B. melitensis* Rev-1 антигенностью обладали белки с мол.м 26, 19, 15 и 12 кД. Отметим, что последние две полосы не обнаруживались в электрофореграмме. Среди высокомолекулярных фракций антигенное свойство установлено у белка с мол.м. 116 кД.

Из состава БВМ *B. abortus* 19 антигенность по отношению к антителам положительной сыворотки проявили белки с мол.м. 57, 19, 17 и 15 кД. Причем, последние две фракции также не окрашивались в электрофореграмме. Следует подчеркнуть, что БВМ *B. abortus* 19 кД и 15 кД и *B. melitensis* 19 кД, 15 кД и 12 кД детектировались антителами сыворотки крови коровы, показавшей положительные результаты на бруцеллез по серологическим тестам и ПЦР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение современной мировой тенденции развития исследований в области диагностики и профилактики бруцеллеза животных показывает, что весьма перспективными компонентами клеток бруцелл в разработке диагностикумов и вакцин выступают БВМ. Мы склонны считать, что БВМ бруцелл вакцинных штаммов, которые, как правило, задерживаются в организме в течение короткого времени (3-4 мес.), менее доступны для иммунной системы организма, чем ЛПС, расположенные на поверхности клетки. Следовательно, у иммунизированных животных антитела вырабатываются, в основном, на антигены ЛПС. В организме инфицированного животного происходит продолжительная непримиримая борьба с возбудителем болезни, который старается укрепиться в излюбленных тканях. Следовательно, иммунная система успевает ознакомиться с более глубоко лежащими компонентами клеточной стенки, т.е. БВМ. В этой связи последние могут быть полезными не только в диагностике бруцеллеза, но и в дифференциации постинфекционных антител от поствакцинальных.

Одним из главных факторов, препятствующих внедрению ИФА-теста на основе БВМ, является недостаточная изученность диагностической ценности отдельных белков, входящих в состав внешней мембраны бруцелл, а также дороговизна и трудоемкость методов получения названного препарата по

сравнению с ЛПС. В этой связи за последние годы для получения диагностически важных компонентов БВМ начали использовать технологию рекомбинантной ДНК, которая позволяет получить высокоочищенные стабильные препараты генно-инженерного БВМ возбудителя бруцеллеза.

Выделенные БВМ обоих видов бруцелл обладали выраженной антигенностью в ИФА по отношению к антителам сывороток крови коров, положительно реагирующих на бруцеллез по результатам двух классических реакций: РА и РСК. В ИФА антитела всех 49 серопозитивных животных показали достоверно высокую активность по отношению к БВМ по сравнению с ЛПС. Так, средний титр антител против полисахаридного антигена находился в пределах 1:610, тогда как антитела, связывающиеся с БВМ бруцелл, обнаруживались до разведения сыворотки крови 1:2110 – 1:4220 ($P < 0,001$).

Как показали исследования, приготовленный нами БВМ существенно превосходил по своей антигенности рекомбинантный белок *rBP26*. Причем, у 8,2% коров, положительно реагирующих на бруцеллез, не были выявлены антитела против рекомбинантного белка в ИФА. Изучение антигенности БВМ обоих видов бруцелл и *rBP26* на образцах сыворотки крови коров, привитых против бруцеллеза вакциной из штамма *B.abortus RB-51*, также показало заметное преимущество нашего препарата в части детекции антител против антигенов вакцинного штамма, лишенной О-цепи ЛПС. Эти данные свидетельствуют о том, что использование в ИФА лишь одного рекомбинантного белка снижает чувствительность серологических исследований. В этой связи при разработке иммуноферментных тест-систем для диагностики бруцеллеза необходимо использовать комбинацию рекомбинантных белков, обладающих ярко выраженными антигенными свойствами, т.е. способностью связываться со специфическими антителами. Аналогичные выводы были сделаны и другими исследователями при изучении диагностической ценности БВМ *B. melitensis* с мол.м. 31 кД [16] и *B. abortus* с мол.м. 10 кД, 19 кД и 28 кД [17].

В результате проведенных исследований установлено, что в составе БВМ обоих видов бруцелл имеются как общие, так и индивидуальные белковые фракции. У *B.abortus* 19 и *B. melitensis Rev-1* наиболее представительными оказались белки с мол.м. 56,7 кД; 55,7 и 58,2 кД, соответственно. Следует отметить, что белок с мол.м. 31,5 кД был детектирован в электрофореграмме обоих видов бруцелл, хотя в некоторых работах исследователи считают его не свойственным *B.abortus* [16]. Причем, следует отметить, что этот белок не обладал антигенностью. Мажорные белки с мол.м. 22,5 и 18,8 кД выявлялись только у *B.abortus*. На наш взгляд, наибольшую перспективность в качестве диагностически важного антигена среди фракций БВМ обоих видов бруцелл имеют белки с мол.м. 18,8-19,1 кД и 15 кД, а также белок *Brucella melitensis* с мол.м. 12 кД, которые показали антигенные свойства в иммуноблоттинге при использовании сыворотки крови коровы, показавшей положительную реакцию на бруцеллез как по результатам серологических тестов, так и ПЦР патматериала. В литературе имеются сообщения о возможности использования БВМ *B.abortus* с мол.м. 19 кД в ИФА для определения специфических антител в сыворотке крови коров [17] и овец [18]. Таким образом, БВМ представляют собой весьма ценный компонент клеточной стенки, в составе которых имеются диагностически важные белки, которые могут быть использованы в разработке высокочувствительных и специфичных серологических тестов.

Финансирование

Работа была выполнена в рамках бюджетной программы 055 Министерства образования и науки Республики Казахстан «Научная и/или научно-техническая деятельность» по проекту «ИФА-тест на основе рекомбинантного белка внешней мембраны возбудителя бруцеллеза» на 2015-2017 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Қысықов Т. Спыр бруцеллезінің Қазақстандағы індеттік жағдайы // Ветеринария (Қаз.). – 2009. – №3(7). – С.44-46.
2. Иванов Н.И. Бруцеллез // AgroЭлем. – 2010. – №2(7). – С.40-47.
3. Плотникова Э.М., Салмаков К.М., Иванов А.В. Иммуномониторинг бруцеллеза животных // Ветеринария (РФ). – 2010. – №5. – С.26-30.
4. Bulashev A.K., Suranshiev Z. Using *Brucella abortus* outer membrane proteins in serodiagnosis of Brucellosis // Abstracts of Eight Annual International Symposium on Agriculture, Third Annual International Conference on Ecology, Ecosystems and Climate Change & Third Annual International Forum on Water. – Athens, Greece, 2015. – P.43-44.
5. Bundle D.R., Gidney M.A., Perry M.B., Duncan J.R., Cherwonogrodzky J.W. Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies // Infection and immunity. – 1984. – №46(2). – P. 89-93.
6. Corbel M.J., Stuart F.A., Brewer R.A. Observations on serological cross – reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera // Dev.Biol.Stand. – 1984. – №56. – P.341-405.
7. Corbel M.J. Recent Advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reactions // Vet. Bull. – 1985. – Vol.55, №12. – P. 927-942.

8. Gupta V.K., Verma D.K., Singh S.V., Vihan V.S. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis // *Small Ruminant Research*. – 2007. – Vol. 70, №2-3. – P. 260-266.
9. Lim J.J., Kim D.H., Lee J.J., Kim D.G., Min W. et al. 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.
10. Ko K.Y., Kim J., Her M. et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis // *Vet. Microbiology*. – 2012. – Vol. 156, №3-4. – P. 374-380.
11. Пат. №14230 Республика Казахстан, G01N 33/535. Способ определения антител против возбудителя бруцеллеза / Шенжанов К.Т., Сураншиев Ж.А., Булашев А.К., Оспанова С.Г.; заявл. 22.07.2002; опубл. 15.04.2008., Бюл. 4. – С. 4.
12. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, №4. – P. 248-254.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – Vol. 76, №9. – P. 4350-4354.
15. Сайдуллин Т.С. Статистическая обработка результатов серологических реакций // *Ветеринария*. – 1981. – №7. – С. 62-66.
16. Cassataro J., Pasquevich K., Bruno L., Wallach J.C., Fossati C.A., Baldi P.C. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae* // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2004. – Vol. 11, №1. – P. 111-114.
17. Simborio H.L., Lee J.J., Bernardo Reyes A.W., Hop H.T., Arayan L.T. et al. 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.
18. Tibor A., Saman E., Wergifosse P. de, Cloeckart A., Limet J.N., 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. – №64(1). – P. 100-107.

REFERENCES

1. Kisykov T. Epidemiological situation in Kazakhstan brucellosis cattle. *Veterinary (Kaz.)*, 2009, vol. 3(7), pp. 44-46.
2. Ivanov N.I. Brucellosis. *J. AgroЭlem*, 2010, vol. 2(7), pp. 40-47.
3. Plotnikova A.M., Salmakov K.M., Ivanov A.V. Immune monitoring of animal brucellosis. *J. Veterinary (RF)*, 2010, vol. 5, pp. 26-30.
4. Bulashev A.K., Suranshiev Z. Using *Brucella abortus* outer membrane proteins in serodiagnosis of Brucellosis. Abstracts of Eight Annual International Symposium on Agriculture, Third Annual International Conference on Ecology, Ecosystems and Climate Change & Third Annual International Forum on Water, Athens, Greece, July 2015, pp. 43-44.
5. Bundle D.R., Gidney M.A., Perry M.B., Duncan J.R., Cherwonogrodzky J.W. Serological confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, 1984, vol. 46 (2), pp. 89-93. PMID: 6437982.
6. Corbel M.J., Stuart F.A., Brewer R.A. Observations on serological cross – reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Dev. Biol. Stand.*, 1984, vol. 56, pp. 341-405. PMID: 6489620.
7. Corbel M.J. Recent Advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross reactions. *Vet. Bull.*, 1985, vol. 55, no. 12, pp. 927-942.
8. Gupta V.K., Verma D.K., Singh S.V., Vihan V.S. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis. *Small Ruminant Research*, 2007, vol. 70, no. 2-3, pp. 260-266.
9. Lim J.J., Kim D.H., Lee J.J., Kim D.G., Min W. et al. 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, no. 6, pp. 687-691. PMID: 22214857.
10. Ko K.Y., Kim J., Her M. et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Vet. Microbiology*, 2012, vol. 156, no. 3-4, pp. 374-380. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.11.011.
11. Patent №14230 Republic of Kazakhstan, G01N 33/535. A method of detecting antibodies against the causative agent of brucellosis. Shenzhanov K.T., Suranshiev Zh.A., Bulashev A.K., Ospanova S.G.; statement 22.07.2002, published 15.04.2008, bulletin 4, p. 4.
12. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, no. 4, pp. 248-254.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685. PMID: 5432063.

14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1979, vol. 76, no. 9, pp. 4350-4354. PMID: 1422008.

15. Sayduldin T.C. Statistical analysis of the results of serological tests. *J. Veterinary*, 1981, no. 7, pp. 62-66.

16. Cassataro J., Pasquevich K., Bruno L., Wallach J.C., Fossati C.A., Baldi P.C. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004, vol. 11, no. 1, pp. 111-114. PMID: 14715555.

17. Simborio H.L., Lee J.J., Bernardo Reyes A.W., Hop H.T., Arayan L.T., Min W. et al. 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, pp. 41-46. doi: 10.1016/j.micpath.2015.05.004.

18. Tibor A., Saman E., Wergifosse P. de, Cloeckaert A., Limet J.N., 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), pp. 100-107. PMID: 8557326.

БРУЦЕЛЛАНЫҢ СЫРТҚЫ МЕМБРАНА АҚУЫЗДАРЫНЫҢ АНТИГЕНДІЛІГІ

Бұлашев А.Қ., Сұраншиев Ж.А., Жұмалин А.Х., Тұрсынов Қ.А.

Ауылшаруашылық биотехнологиясы ғылыми-зерттеу институты
Ы. Алтынсарин к-сі 2, Астана, 010011, Қазақстан
kanat_tka@mail.ru

ТҮЙІН

Бруцеллезбен күрес шараларының тиімділігін арттыру үшін ауруға шалдыққан жануарларды дер кезінде анықтап, оқшаулап отыру керек. Бруцеллездің диагностикасында қолданылып жүрген коммерциялық ИФТ-жинақтарында антиген ретінде липополисахаридтер (ЛПС) қолданыс тапқан. Алайда, қоздырғыш жасушасының аталмыш компонентінің бруцеллалар мен басқа грам-теріс бактериялар арасындағы айқыш реакцияларға себепкер болатындығы жақсы белгілі. Осыған байланысты, қазіргі кезде бруцеллалардың тек өз тұқымына ғана емес, сонымен қатар жекеленген түрлеріне телімді болып келетін сыртқы мембрана ақуыздарын (СМА) зерттеу өте өзекті мәселелердің біріне айналып отыр. Мақалада *Brucella abortus* 19 және *Brucella melitensis* Rev-1 бөлініп алынған СМА-дары жасушаның ЛПС-тарымен салыстырғанда АР және КБР бойынша бруцеллезге оң нәтиже берген сиырлардың қан сарысуына қарсы анағұрлым жоғарырақ антигенділік қасиеттерді көрсететіндігі дәлелденген. СМА өзінің диагностикалық құндылығы жағынан молекулалық салмағы 26 кД болатын *B. abortus*-тың рекомбинантты ақуызынан (rBP26) асып түскен. СМА-ның rBP26-дан артықшылығы *B. abortus* RB-51 қатпарлы штамынан жасалған вакцинамен егілген сиырларды серологиялық зерттеу кезінде де байқалған. Қол жеткізілген нәтижелергесүйене отыра, бруцеллез диагностикасына арналған тест-жүйелерін әзірлеу үшін антигендік қасиеттерді иеленген бір емес бірнеше рекомбинантты ақуыздарды қолдану керектігі туралы қорытынды жасалған. Бруцеллалардың екі түрінен алынған СМА-ның молекулалық салмақтары 19 кД және 15 кД болатын фракциялары және *Brucella melitensis*-тің молекулалық салмағы 12 кД болатын ақуызы диагностикалық маңызды антиген ретінде танылған. Аталмыш ақуыздар Вестер-блоттинг тәсілінде бруцеллезге серологиялық реакциялар мен ПТР тәсілі бойынша оң нәтиже көрсеткен сиырлардың қан сарысуындағы антиденелерге қарсы айрықша антигенділік көрсеткен.

Негізгі сөздер: сыртқы мембрана ақуыздары, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, антигенділік, ИФТ.