

APPLICATION OF THE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST KIT FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS BASED ON RECOMBINANT ANTIGEN

Manat E., Sarina N.I., Eskendirova S.Z., Shustov A.V., Mukanov K.K.

*National center for biotechnology
13/1, Sh. Valikhanovst., Astana, 010000, Kazakhstan
bionis_ns@mail.ru*

ABSTRACT

Despite the significant progress jointly made by scientists and practical veterinary service in the Republic of Kazakhstan, the problem of animal brucellosis has not been completely solved. Consistently high levels of human brucellosis morbidity, which is due to extremely tense epizootic situation and large socio-economic damage, determine the special importance of this infection in the structure of infectious pathologies. One of the potential to increase the sensitivity and specificity of serological diagnostic methods of brucellosis is the use of recombinant analogs of immunodominant proteins of pathogenic *Brucella*, which diversity has determined and studied at the present time. Periplasmic protein *BP26* is a specific antigen which is highly conserved for genus of *Brucella*. It has high diagnostic value for use in the development of immunoassays and immunochromatographic test kits of brucellosis for the veterinary and medical use.

A highly sensitive and specific immunoassay system for rapid detection of antibrucellar antibodies was developed on the basis of recombinant *Brucella* antigen *BP2*. It is intended for serological diagnosis of brucellosis in animals. High diagnostic efficiency of ICA was tested in 962 samples of blood serum of cattle and goats, sheep as well as 16 control reference sera.

Keywords: [immunochromatographic](#) assays, recombinant antigen, blood serum, antibody.

УДК 619:616.98

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА

МанатЕ., СаринаН.И., ЕскендиловаС.З., ШустоваА.В., МукановК.К.

*Национальный центр биотехнологии
ул. Ш. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан
bionis_ns@mail.ru*

АБСТРАКТ

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в Республике Казахстан совместными усилиями научного потенциала и практической ветеринарной службы, проблема ликвидации бруцеллеза животных окончательно не решена. Стабильно высокий уровень заболеваемости бруцеллезом людей, обусловленный крайне напряженной эпизоотической ситуацией, и большой социально-экономический ущерб определяют особую значимость этой инфекции в общей структуре инфекционных патологий. Одним из потенциалов повышения чувствительности и специфичности серологических методов диагностики бруцеллеза является использование рекомбинантных аналогов иммунодоминантных белков патогенных бруцелл, спектр которых окончательно определен и изучен в настоящее время. Периплазматический белок *BP26* является специфическим антигеном, высококонсервативным для всего рода *Brucella*, и обладает большой диагностической ценностью для использования в разработке иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем на бруцеллёз как ветеринарного, так и медицинского применения.

На основе рекомбинантного антигена бруцелл *BP26* разработана высокочувствительная и специфичная иммунохроматографическая тест-система для экспресс-обнаружения противобруцеллезных антител, предназначенная для серологической диагностики бруцеллеза животных. Высокая диагностическая эффективность ИХА определена на 962 испытуемых образцах сывороток крови крупного и мелкого рогатого скота, а также 16 контрольных референс-сыворотках крови.

Ключевые слова: иммунохроматографическая тест-система, рекомбинантный антиген, сыворотка крови, антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в Республике Казахстан совместными усилиями научного потенциала и практической ветеринарной службы, проблема ликвидации бруцеллеза животных окончательно не решена. Стабильно высокий уровень заболеваемости бруцеллезом людей, обусловленный крайне напряженной эпизоотической ситуацией, и большой социально-экономический ущерб определяют особую значимость этой инфекции в общей структуре инфекционных патологий. В связи с этим крайне востребованы методы, обеспечивающие эффективную серологическую диагностику этого заболевания сельскохозяйственных животных. Общепринятые серологические реакции – РА, РСК и РБП, используемые в диагностике бруцеллеза, отличаются между собой по аналитической чувствительности к определенным классам иммуноглобулинов и, поэтому, каждая из них в отдельности характеризуется относительно низкой объективностью, чем при комплексном применении.

Комплексные диагностические исследования на бруцеллез способны провести только специализированные ветеринарные лаборатории, что создает дополнительные трудности при проведении профилактических и карантинных мероприятий. Кроме того, препараты как интактных клеток бруцелл, так и их полисахаридные антигены, содержат на своей поверхности антигенные детерминанты, общие для бруцелл и других близкородственных грамотрицательных микроорганизмов – *Yersinia enterocolitica* 09, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* группы N и др., что приводит к получению ложноположительных результатов и может быть причиной необоснованного убоя животных [1-7].

Хотя современные инструментальные методы выявления постинфекционных антител в сыворотке крови – иммуноферментный анализ (ИФА) – характеризуются высокой степенью точности, они трудоемки, сложны, занимают много времени, требуют высококвалифицированного персонала и дорогостоящего оборудования, что ограничивает их применение в технически оснащенных ветеринарных лабораториях. Поэтому растет потребность в методически простых и доступных для широкого круга пользователей экспресс-методах иммуноанализа, позволяющих проводить определение в малооборудованных лабораториях, в полевых и домашних условиях и не уступающих по аналитическим характеристикам. Многим из перечисленных условий удовлетворяет иммунохроматографический анализ, что делает его одним из наиболее перспективных среди других современных иммунодиагностических тестов. Чувствительность определения с помощью иммунохроматографических тест-полосок не уступает чувствительности иммуноферментного анализа или вестерн-блота, при этом, в отличие от последних, иммунохроматография не требует длительных инкубаций или промывок и не нуждается в дополнительном оборудовании. Эти тест-системы нашли широкое применение в медицинской практике (определение наркотических средств, ранняя диагностика беременности, скрининг особо опасных инфекций и урогенитальных заболеваний), в сельскохозяйственном мониторинге.

Одним из потенциалов повышения чувствительности и специфичности серологических методов диагностики бруцеллеза является использование рекомбинантных аналогов иммунодоминантных белков патогенных бруцелл, спектр которых окончательно определен и изучен в настоящее время. На современном этапе технология получения рекомбинантных белков является основой в разработке и создании диагностических препаратов нового поколения при ряде инфекционных заболеваний. Технология, основанная на использовании генетически трансформированного штамма-продуцента, в отличие от традиционных технологий, позволяет получать высокоочищенные стабильные препараты рекомбинантных антигенов возбудителя болезни. Характерной особенностью микроорганизмов рода *Brucella* является высокая гомологичность их ДНК и отсутствие гомологии с представителями других родов микроорганизмов. При этом изменчивость бруцелл (диссоциация, трансформация и т.п.) не ведет к заметной дивергенции их генома. Следовательно, использование белковых антигенов не только дополняет общепринятую систему тестов идентификации бруцелл, но и во многих случаях является единственным достоверным показателем принадлежности штаммов к роду *Brucella* [5-10].

Белки внешней мембраны (*Outer membrane proteins* – *OMP*) бруцелл широко рассматриваются зарубежными исследователями как более специфичные компоненты в создании новых вакцинных и диагностических препаратов. Предполагается, что именно белки внешней мембраны определяют вирулентность и специфичность бруцелл. Белки внешней мембраны (*OMP*) бруцелл были идентифицированы в 80-е годы прошлого столетия различными группами исследователей. Впервые J.E. Mayfield et al. (1988) изолировали и клонировали ген, кодирующий белковый антиген *Brucella abortus* с молекулярной массой 31 кДа (*OMP31*) и экспрессировали его в геном кишечной палочки. Нуклеотидная последовательность гена *OMP31* была использована для разработки ПЦР-анализа. Исследователями была определена эффективность рекомбинантного аналога *OMP31* для обнаружения противобруцеллезных антител методом ИФА [11-13]. T.A. Ficht et al. (1988; 1989) клонировали гены *Omp 2L* и *Omp 2a Brucella abortus*, ответственные за синтез пориновых белков с молекулярной массой 36 и 33 кДа [14]. Успешно осуществлены другими исследователями клонирование и экспрессия в гетерологичной системе периплазматического белка бруцелл *Cu-Zn-SOD* [15-17], рибосомального белка *L7/L12* [18,19] и цитоплазматических белков теплового шока – *GroEL* и *HspGroES* [3,7,10], относящихся к категории иммуногенных белков бруцелл обладающих выраженными протективными свойствами.

Периплазматический белок *BP26* был выбран нами в качестве потенциального антигена для использования в диагностической тест-системе по нескольким причинам. Во-первых, согласно последним данным научной

литературы, он вырабатывается бруцеллами на всех стадиях развития инфекции и является одним из наиболее узнаваемых иммунной системой как человека, так и животных специфических антигенов бруцелл. Этот белок является иммунологически доминантным антигеном бруцелл, и антитела к нему формируются практически у всех зараженных бруцеллезом животных. Иммуноферментные тест-системы на основе рекомбинантного антигена позволили диагностировать бруцеллез в 95,4-96,7% случаев. Кроме того, антитела к *BP26*, обнаруживаемые в сыворотках больных бруцеллезом на всех стадиях течения заболевания, обладают высокой специфичностью и не имеют кросс-реактивности с антигенами других близкородственных микроорганизмов [20-26]. Во-вторых, *BP26* – самый небольшой из известных белков внешней мембраны бруцелл, и его небольшой размер повышает вероятность успешной гетерологичной экспрессии в лабораторных штаммах *E. coli*. Первичная структура антигена *BP26* аннотирована в базе данных *NCBI (GenBank)* и, согласно данным литературы, чрезвычайно консервативна для всех видов и штаммов бруцелл [27-30]. Белок *BP26* выполняет функцию трансмембранного рецептора, локализованного в периплазматическом пространстве клеточной стенки бруцелл. Сравнительно недавно исследователями представлена информация о конформационной структуре и моделировании пространственной организации белка *BP26* [31]. В третьих, большинство последних зарубежных исследований по совершенствованию серологической диагностики бруцеллеза основаны на использовании рекомбинантного антигена *BP26*. Анализ нуклеотидной последовательности *BP26* как патогенных, так и вакцинных штаммов и видов бруцелл показал их полную идентичность. *BP26* является высококонсервативным белком для штаммов бруцелл из различных географических регионов мира, что доказано исследованиями референтных сывороток методом иммуноблоттинга [25-30].

Поскольку *BP26* является специфическим антигеном, высококонсервативным для всего рода *Brucella*, данный антиген обладает большой диагностической ценностью для использования в разработке иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем на бруцеллез как ветеринарного, так и медицинского применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являются рекомбинантный антиген *BP26*, исследуемые сыворотки крови крупного и мелкого рогатого скота, конъюгаты иммуноглобулинсвязывающего белка – протеина G с коллоидным золотом.

В работе применяли козы поликлональные антитела против IgG крупного рогатого скота («Sigma», США), рекомбинантный протеин G («Sigma», США), золото хлористоводородную кислоту, Твин-20, бычий сывороточный альбумин (БСА), цитрат натрия, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl . Все соли были аналитической или химической чистоты.

Растворы для получения КЗ и его конъюгатов готовили на воде, деионизированной с помощью установки MilliQ («Millipore», США).

Рекомбинантный антиген *BP26* очищали на колонке HisTrap («Amersham», США) с использованием хроматографической системы AktaFPLC («Amersham», США).

Определение аналитической чувствительности рекомбинантного антигена *BP26* с помощью непрямого твердофазного ИФА

Рекомбинантный антиген возбудителя бруцеллеза *BP26* сорбировали в лунках микропланшета в течение ночи при 4°C 100 мкл раствора с концентрацией от 10 мкг/мл до 1 мкг/мл в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,4, с 0,1 М NaCl (ФСБ). Микропланшет четырехкратно промывали ФСБ с 0,05% Tween 20 (ФСБТ), после чего в лунки вносили по 100 мкл позитивных и негативных контрольных сывороток в разведении 1:100 и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем микропланшет повторно промывали, добавляли 100 мкл антивидового иммунопероксидазного конъюгата (разведение 1:5000 в ФСБТ) и инкубировали 1 ч при 37°C. После промывания определяли каталитическую активность связанной с носителем метки. Для этого использовали субстрат пероксидазы – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (0,4 мМ) в 40 мМ натрий цитратном буфере, pH 4,0, с 3 мМ H_2O_2 . В лунки микропланшета вносили по 100 мкл субстрата, инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре, останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1 М H_2SO_4 и измеряли поглощение продуктов ферментативной реакции при длине волны 450 нм (A450).

Получение коллоидного золота цитратным методом по G. Frens (1973) [32]

К 97,5 мл деионизированной воды добавляли 1,0 мл 1%-ного раствора HAuCl_4 , доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1,5 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили еще 25 мин, затем охлаждали и хранили при 4-6°C.

Электронная микроскопия

Препараты коллоидного золота наносили на специальные сеточки (400 меш. Formvar/Carbon «Ted Pella, Inc.», США). Снимки получали на электронном микроскопе Carl Zeiss («LIBRA 12», Германия). Фотографии получали в программе «JTEM» при увеличении 200000-250000.

Получение флокуляционной кривой

Определение оптимального количества иммуноглобулинсвязывающего белка G, иммобилизованного на коллоидных частицах золота (построение флокуляционной кривой), осуществляли на спектрофотометре Microplate Reader Model 680 («Bio-Rad», США) при длине волны 580 нм. Готовили ряд разведений протеина G с концентрациями в диапазоне от 880 до 0,44 мкг/мл. По 20 мкл этих растворов добавляли в лунки микропланшета к 200 мкл раствора коллоидного золота ($OP_{520}=1$). После инкубации в течение 10 мин. при комнатной температуре в каждую лунку вносили по 20 мкл 10%-ного раствора NaCl, через 10 мин. измеряли OP_{580} и строили ее зависимость от концентрации антител. Определяли точку выхода полученной зависимости (флокуляционной кривой) на плато и выбирали для конъюгирования концентрацию АТ, на 10-15% превышающую эту величину.

Получение конъюгатов иммуноглобулинсвязывающих белков – белок А и белок G – коллоидное золото по G. Hermanson (2008) [33]

Перед конъюгированием с частицами коллоидного золота протеин G диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ соответствующего буфера, pH 9,0 в течение 2 ч при 4°C. К коллоидному золоту ($A_{520}=1,0$) добавляли 0,1М K_2CO_3 до достижения pH 9,5, после чего вносил в раствор протеин G в выбранной концентрации. Смесь инкубировали 45 мин при комнатной температуре и перемешивании, затем добавляли БСА до конечной концентрации 0,25%. Частицы коллоидного золота с иммобилизованным на них иммуноглобулинсвязывающим белком G отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в ФСБ, содержащем 0,05% БСА и 0,05% Tween 20 (ФСБТ). При необходимости длительного хранения к полученному продукту добавляли азид натрия до конечной концентрации 0,02%.

Определение количества иммуноглобулинсвязывающего белка – протеина G, иммобилизованного на коллоидных частицах

Препараты надосадочной жидкости, полученные после осаждения конъюгатов «протеин G – коллоидное золото» и растворы иммуноглобулинсвязывающего белка G в известной концентрации (от 0,1 до 100 нг/мл) вносили в лунки микропланшета и сорбировали в течение ночи при 4°C в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,4, с 0,1М NaCl (ФСБ). Микропланшет четырехкратно промывали ФСБ и ФСБ с 0,05% Tween 20 (ФСБТ), после чего в лунки вносили по 100 мкл раствора антивидового иммунопероксидазного конъюгата (разведение 1:5000 в ФСБТ) и инкубировали 1 ч при 37°C. По оптической плотности продукта реакции связавшегося фермента строили градуировочную зависимость для свободных иммуноглобулинсвязывающих белков, проводили расчет для препаратов надосадочной жидкости конъюгата «протеин G – коллоидное золото» и, исходя из полученных результатов, определяли количество белка, иммобилизованного на КЗ.

Спектрофотометрические измерения оптической плотности препаратов коллоидного золота и их конъюгатов проводили на спектрофотометре PD-303 UV «Apel», Япония.

Определение pH буферных растворов проводили на аппарате Professional Meter PP-20 «Sartorius», Германия.

Концентрацию белка в препаратах определяли по M. Bradford (1976) [34].

Изготовление иммунохроматографических тест-полосок

В комплектацию иммунохроматографических тест-полосок входили мембраны mdi Easy pack («Advanced Microdevices», Индия). На автоматическом диспенсере BioDot («Imagene Technology», США) на подложку наносили конъюгат «протеин G – коллоидное золото» в разведении, соответствующем $A_{520}=2,0$ (32 мкл на 1 см полосы). Для формирования аналитической зоны использовали рекомбинантный антиген BP26, контрольной зоны – IgG из антисывороток против IgG крупного рогатого скота. В обоих случаях на 1 см полосы наносили 2 мкл раствора с концентрацией 0,5 мг/мл в ФСБ с 10% глицерина. Собранный мультимембранный композит разрезали на автоматическом нарезчике Index Cutter/1 («A/Point Technologies», США) на полоски размером 78×3,5 мм. Нарезку и высушивание иммунохроматографических тест-полосок проводили при 20-22°C в специальном помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%.

Иммунохроматографический анализ

Иммунохроматографический анализ проводили при комнатной температуре. Тест-полоску в вертикальном положении погружали в анализируемую пробу на 1,5 мин., затем извлекали и помещали на горизонтальную поверхность. Результат контролировали через 10 мин. после начала анализа визуально в условных единицах.

Результаты серологических исследований подвергались статистической обработке [35].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально по стандартной методике нами был получен золь коллоидного золота (КЗ), средний диаметр частиц которого составил 27 ± 5 нм. Размер частиц 25-30 нм оптимален для сорбции белка и последующей миграции полученного комплекса через поры мембран иммунохроматографической тест-полоски.

Электронная микроскопия показала высокую степень однородности частиц коллоидного золота по размерным характеристикам (со средним диаметром 27 нм), что соответствует общепринятым рекомендациям по оптимальному размеру коллоидных частиц для использования в иммунохроматографическом анализе (рис.1).

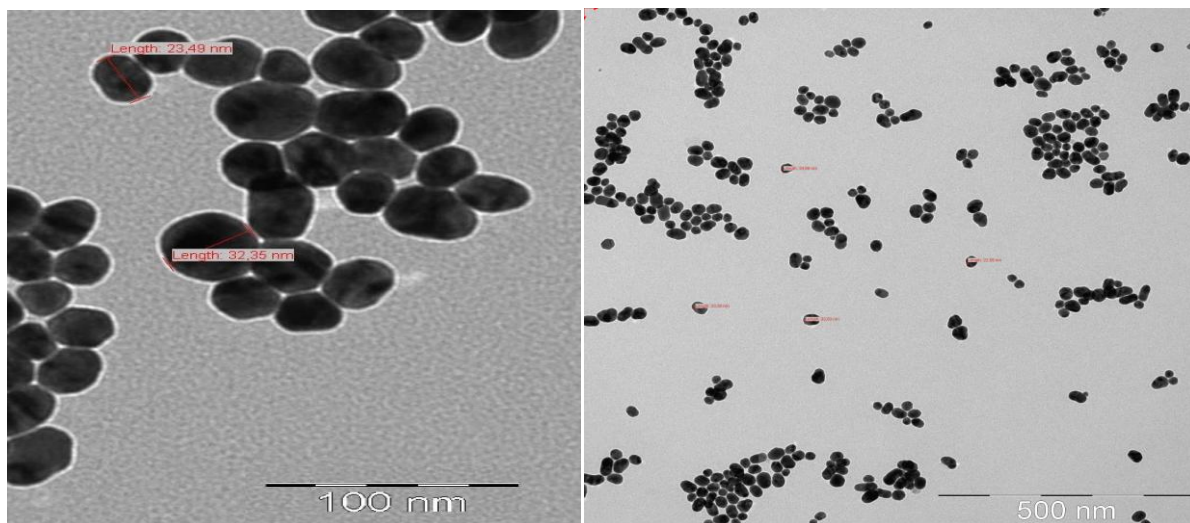


Рис.1.Электронная микрофотография частиц коллоидного золота

Fig. 1. Electronicmicrography image of the colloidal gold particles

Традиционно процесс иммобилизации моноклональных или поликлональных антител на частицах коллоидного золота (КЗ) характеризуют флокуляционной кривой, в которой наблюдаемая в присутствии избытка соли агрегация должна отражать наличие поверхности частиц КЗ, не защищенной иммобилизованным белком (Hermanson, 2008). Для определения концентрации иммуноглобулинсвязывающего белка – протеинаG, оптимального для получения стабильных, неагрегирующихконъюгатов с коллоидным золотом, процесс контролировали по величине D_{580} в присутствии 10% NaCl (рис. 2).

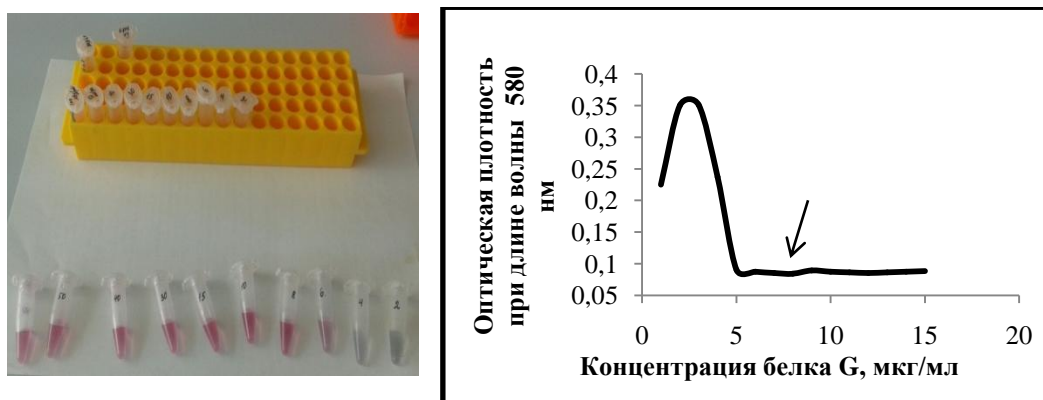


Рис.2.Изучение стабильности комплекса коллоидного золота с протеиномG методом флокуляции и флокуляционная кривая их взаимодействия

Fig. 2.The study of the stability of colloidal gold complex with a protein G by flocculation method and flocculation curve of their interaction

Как видно из рисунка 2, полученная зависимость D_{580} от концентрации белка G соответствуют существующим представлениям о конъюгировании белков с коллоидным золотом. Увеличение количества молекул белка стабилизирует частицы КЗ, предотвращая их агрегацию в растворе с большой ионной силой; при этом D_{580} возрастает, доходит до максимума и начинает снижаться, выходя на плато. На основании полученной зависимости выбирали концентрацию белка, на 10-15% превосходящую точки выхода D_{580} на плато, как рекомендовано для обеспечения максимальной стабильности конъюгата. Оптимальная концентрация протеинаG для иммобилизации на коллоидных частицах составила 8 мкг на 1 мл суспензии КЗ.

Диагностическая эффективность ИХА – ВР26 была определена на 962 позитивных и негативных образцах сывороток крови крупного и мелкого рогатого скота, полученных от РГП «Республиканская ветеринарная

лаборатория» с представленными результатами серологического тестирования в РА и РСК. Показатели серологической активности в РА и РСК позитивных сывороток представлены на рисунке 3.

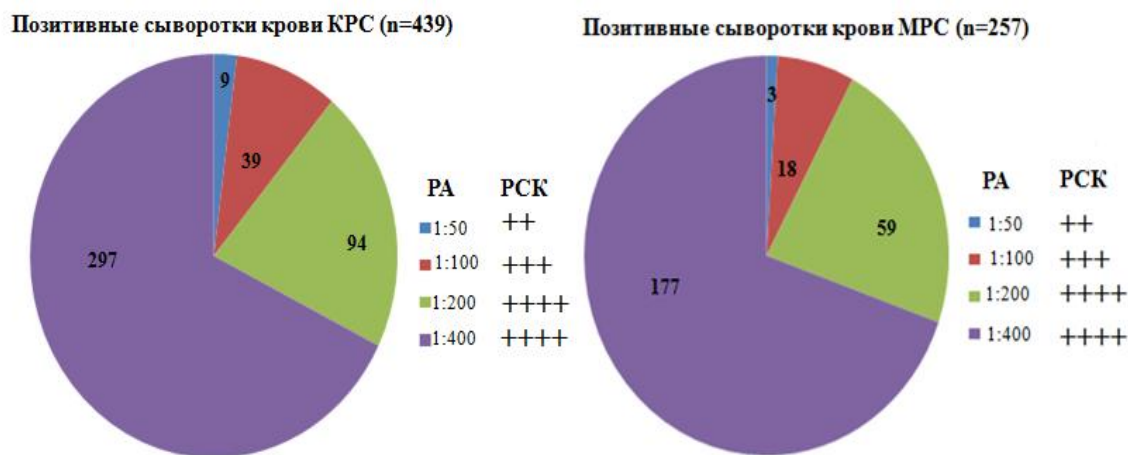


Рис. 3. Показатели серологической активности в РА и РСК позитивных сывороток

Fig. 3. Indicators of serological activity of the positive serum in agglutination and complement fixation test

Как видно из рисунка 3, серопозитивными в РА и РСК являются 439 (69,5%) проб сывороток крови крупного рогатого скота (КРС) из 623 исследуемых, и 257 (74,6%) образцов сывороток крови мелкого рогатого скота (МРС) из 339 исследуемых. Значительная часть положительно реагирующих сывороток как КРС, так и МРС (до 70%) содержали максимальные титры агглютинирующих (1:400) и комплементсвязывающих антител (1:10), что свидетельствует о наличии у животных активной фазы инфекционного процесса. Следует отметить, что общепринятые серологические тесты – РА и РСК выявляют приблизительно одинаковое количество положительно реагирующих животных. Исходя из показателей серологической активности в РА и РСК, все испытуемые сыворотки КРС и МРС были распределены на четыре группы: 1 гр. – титры антител в РА 1:50 и в РСК 1:10++; 2 гр. – РА 1:100 и в РСК 1:10+++; 3 гр. – РА 1:200 и в РСК 1:10++++; 4 гр. – РА 1:400 и в РСК 1:10++++.

Все испытуемые образцы сывороток крови КРС и МРС были исследованы в непрямом варианте ИФА в двух вариантах – с использованием в качестве антигена липополисахарида (ЛПС) бруцелл (в концентрации 10 мкг/мл) и рекомбинантного антигена *BP26* (в концентрации 1 мкг/мл). Это обусловлено тем, что ИФА является более чувствительным методом, чем РА и РСК. Анализ, проведенный различными исследователями на большом поголовье животных из хозяйств с разной степенью распространения бруцеллезной инфекции, свидетельствует о том, что при помощи ИФА всегда дополнительно выявляются животные, не выявленные классическими серологическими реакциями. Зачастую это связано с недостаточным для предела чувствительности РА и РСК низким уровнем иммунного ответа. В исследованиях при помощи ИФА удалось дополнительно выявить от 1,55 до 3,43% инфицированных животных из числа отрицательных в РА и РСК. Зависимость значений оптической плотности (ОП) позитивных сывороток в ИФА от показателей титров антител в РА и РСК представлена на рисунке 4.

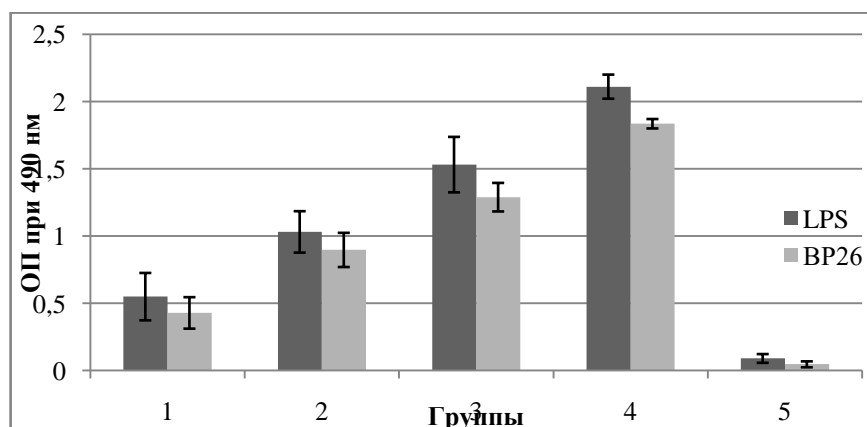


Рис. 4. Зависимость значений оптической плотности (ОП) позитивных сывороток в ИФА от показателей титров антител в РА и РСК

Fig. 4. The dependence of the optical density value (OD) of positive serum in ELISA from indicators of antibody titers in the agglutination and complement fixation test

Как видно из рисунка 4, антигенная активность рекомбинантного антигена *BP26* при обнаружении противобруцеллезных антител в испытуемых сыворотках методом ИФА по параметрам оптической плотности (ОП) аналогична параметрам ОП при использовании в качестве антигена липополисахарида (ЛПС) бруцелл. Установлено, что значения оптической плотности (ОП) позитивных сывороток в ИФА-*BP26* находятся в прямой зависимости от показателей их титров в РА и РСК. Так, максимально зарегистрированные значения ОП $2,117 \pm 0,189$ в ИФА-*BP26* отмечены при тестировании позитивных сывороток крови четвертой группы с максимальными титрами в РА – 1:400 и РСК – 1:10. При этом фоновая активность негативных сывороток при использовании рекомбинантного антигена *BP26* (ОП $0,049 \pm 0,007$) оказалась в два раза ниже аналогичного показателя ОП, полученного на основе ЛПС (ОП $0,136 \pm 0,012$).

Результаты определения диагностической эффективности ИХА тест-системы на испытуемых образцах сывороток крови КРС и МРС представлены в таблице 1.

Таблица 1. Апробация иммунохроматографической тест-системы на основе рекомбинантного антигена *BP26* (ИХА-*BP26*)

Table 1. Testing of the immunochromatographic test-system based on recombinant antigen *BP26*

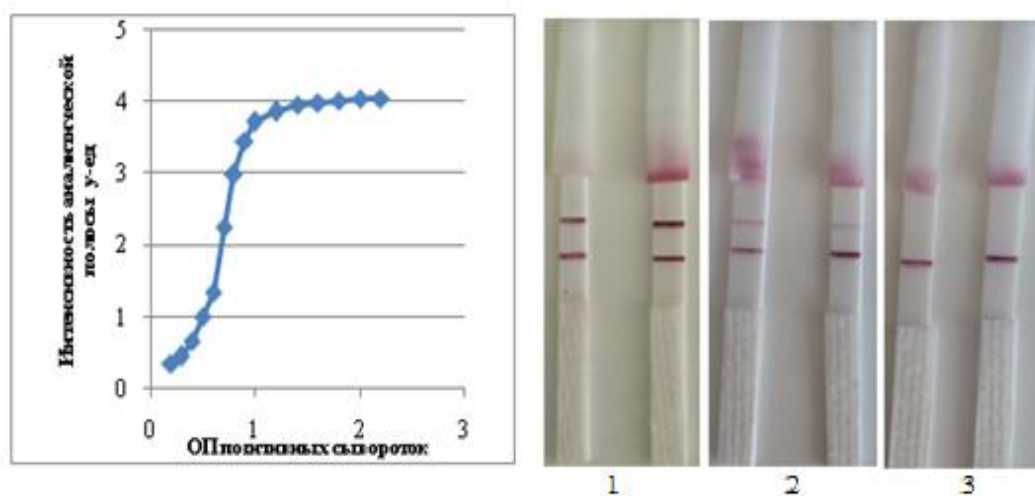
Методы		Результаты тестирования иммунохроматографической тест-системой ИХА- <i>BP26</i>													
		Сыворотки крови КРС n=623		Se, %	Sp, %	κ	De	P	Сыворотки кро ви МРС n=339		Se, %	Sp, %	κ	De	P
		ИХА- <i>BP26</i> + n=439	ИХА- <i>BP26</i> - n=184						ИХА- <i>BP26</i> + n=257	ИХА- <i>BP26</i> - n=82					
РА	+	428	5	97,2	97,4	0,933	0,97	< 0,01	250	3	96,3	97,2	0,926	0,97	< 0,01
	-	11	179						7	79					
РСК	+	431	2	98,9	98,1	0,954	0,98	< 0,01	253	1	98,7	98,4	0,950	0,98	< 0,01
	-	8	182						4	81					
ИФА- ЛПС	+	436	7	96,1	99,3	0,953	0,98	< 0,01	255	6	92,6	99,2	0,923	0,97	< 0,01
	-	3	177						2	76					
ИФА- <i>BP26</i>	+	439	0	100	100	1	1	< 0,01	257	0	100	100	1	1	< 0,01
	-	0	184						0	82					

Примечания:
КРС – крупный рогатый скот;
МРС – мелкий рогатый скот;
Se – чувствительность;
Sp – специфичность;
κ – согласованность;
De – диагностическая эффективность;
P – достоверность.

Как видно из таблицы 1, сывороточные антитела всех серопозитивных по результатам классических реакций – РА и РСК на бруцеллез животных активно связывались с рекомбинантным антигеном *BP26* как в ИФА, так и в ИХА, что свидетельствует о высокой диагностической ценности испытуемой тест-системы. Следует отметить, что в группе РА-отрицательных животных (как КРС, так и МРС) получены положительные результаты ИХА-*BP26* при тестировании 18 (11+7) образцов сывороток крови, в группе РСК-отрицательных – 12 (8+4) образцов и в группе ИФА-ЛПС-отрицательных – 5 (3+2) образцов. В группе серопозитивных по данным РА животных выявлены как ИХА-отрицательные 8 (5+3) проб, в группе РСК-позитивных – 3 (2+1) пробы, и в группе ИФА-ЛПС-позитивных – 10 (7+3) проб.

Оценку информативности диагностического ИХА-метода производили по следующим параметрам: специфичность (Sp) – доля истинно отрицательных результатов, чувствительность (Se) – доля истинно положительных результатов и диагностическая эффективность (De) – доля правильных результатов. Как видно из таблицы 1, испытуемая тест-система демонстрирует высокие показатели как специфичности (96,3-98,9), так и чувствительности (97,2-98,4) по отношению к классическим серологическим тестам – РА и РСК. Диагностическая эффективность тест-системы (т.е. сумма истинно положительных и истинно отрицательных результатов среди всех исследуемых сывороток) составила 0,97-0,98. Расчет коэффициента каппа (κ) был использован для оценки согласованности полученных результатов между двумя методами исследования. Если $\kappa > 0,75$, согласованность считается высокой, если $0,4 < \kappa \leq 0,75$ – хороший, менее 0,4 – плохой. В наших исследованиях данный коэффициент достигал значения 0,923-0,954.

Учет и динамика интенсивности проявления аналитической полосы при исследовании испытуемых сывороток методом ИХА представлены на рисунке 5.



1 – положительный; 2 – слабо положительный; 3 – отрицательный

Рис. 5. Учет результатов и динамика интенсивности проявления аналитической полосы в зависимости от показателей оптической плотности испытуемых сывороток

1 – positive; 2 – weak positive; 3 – negative

Fig.5. Analysis of results and display intensity dynamics of the analytical band depending on the optical density of test serum

Как видно из рисунка 5, показатели интенсивности проявления аналитической полосы ИХА на основе рекомбинантного антигена *BP26* (ИХА-*BP26*) находятся в прямой зависимости от показателей экстинции (ОП) позитивных сывороток в ИФА как с ЛПС, так и рекомбинантным *BP26*. Так, максимальная яркость аналитической полосы достигалась при тестировании положительных сывороток со значениями ОП 0,750-0,800, тогда как нижний предел значений ОП позитивных сывороток, для которого достоверно детектируется окрашивание аналитической зоны, составил 0,250-0,300.

На заключительном этапе апробации было проведено определение специфичности и достоверности результатов иммунохроматографической тест-системы на 16 контрольных сыворотках –референс-сыворотках позитивной бруцеллезной и негативной (рекомендована МЭБ) («*Instituto G. Caporale*», Италия), сыворотках диагностических бруцеллезных моноспецифических *anti-abortus* и *anti-melitensis* (производства Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций – КНЦКЗИ), позитивных бруцеллезных и негативных сыворотках («*Покровский завод биопрепаратов*», Россия и НПО «*Антиген*», Казахстан), а также трех сывороток крови аборт-плодов – №43,47 и 109. В качестве отрицательных контрольных сывороток использовали фетальную сыворотку («*Sigma*», США), сыворотку крови крупного рогатого скота («*Панэко*», Москва), сыворотки лептоспирозные двух серогрупп (ФГУП «*Армавирская биофабрика*», Россия) и сыворотку сальмонеллезную (НПО «*Биоконт*», Россия). Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2. Определение специфичности и достоверности результатов иммунохроматографической тест-системы на контрольных (референс) сыворотках

Table 2. Determination of the specificity and reliability of the results of immunochromatographic test-systems using control serum

Сыворотки крови Blood serum	Методы тестирования				
	Testing methods				
	РА	РСК	ИФА-ЛПС	ИФА- <i>BP26</i>	ИХА
	SAT	CFT	ELISA-LPS	ELISA- <i>BP26</i>	ICA
Референс-сыворотка крови позитивная бруцеллезная МЭБ (« <i>Instituto G. Caporale</i> », Италия)	1:3200	1:10	1:25600	1:12800	++++
Референс-сыворотка кровинегативная, МЭБ (« <i>Instituto</i>	PO	PO	PO	PO	PO

G.Saporale», Италия)					
Сыворотка крови диагностическая бруцеллезная моноспецифическая anti-abortus (КНЦКЗИ)	1:1600	1:10	1:6400	1:3200	++++
Сыворотка крови диагностическая бруцеллезная моноспецифическая anti-melitensis (КНЦКЗИ)	1:1600	1:10	1:6400	1:3200	++++
Сыворотка крови аборт-плода №43 (ПЦР+) (НЦМР)	1:400	1:10	1:12800	1:12800	++++
Сыворотка крови аборт-плода №47 (ПЦР+) (НЦМР)	1:400	1:10	1:12800	1:6400	++++
Сыворотка крови аборт-плода №109 (ПЦР+) (НЦМР)	1:400	1:10	1:6400	1:6400	++++
Позитивная бруцеллезная сыворотка крови («Покровский завод биопрепаратов», Россия)	1:400	1:10	1:25600	1:12800	++++
Негативная сыворотка крови («Покровский завод биопрепаратов», Россия)	PO	PO	PO	PO	PO
Позитивная бруцеллезная сыворотка крови (НПО «Антиген», Казахстан)	1:400	1:10	1:25600	1:12800	++++
Негативная сыворотка крови (НПО «Антиген», Казахстан)	PO	PO	PO	PO	PO
Фетальная сыворотка («Sigma», США)	PO	PO	PO	PO	PO
Сыворотка крови крупного рогатого скота («Панэко», Москва)	PO	PO	PO	PO	PO
Сыворотка лептоспирозная агглютинирующая, серогруппа Гебдомадис (ФГУП «Армавирская биофабрика», Россия)	PO	PO	PO	PO	PO
Сыворотка лептоспирозная агглютинирующая, серогруппа Помона (ФГУП «Армавирская биофабрика», Россия)	PO	PO	PO	PO	PO
Сыворотка сальмонеллезная агглютинирующая (НПО «Биоконт», Россия)	PO	PO	PO	PO	PO

Как видно из таблицы 2, иммунохроматографическая тест-система демонстрирует высокую специфичность при определении противобруцеллезных антител во всех позитивных контрольных референс-сыворотках. Полученные результаты при тестировании ИХА полностью соответствуют исходным характеристикам референс-сывороток, что подтверждает диагностическую эффективность ИХА для выявления зараженных бруцеллезом животных. Достоверность результатов ИХА доказана исследованием референтных сывороток крови от животных сведенной гемокультурой бруцелл из цельной крови и положительной ПЦР. Высокий уровень специфической активности испытуемых позитивных референс-сывороток подтвержден показателями титров сывороточных антител против ЛПС и рекомбинантного *BP26* в непрямом ИФА – 1:3200-1:25600. При анализе в ИХА всех отрицательных контрольных сывороток отсутствовало окрашивание в аналитической тест-полоске, что свидетельствует о специфичности разработанной ИХА тест-системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе рекомбинантного антигена бруцелл *BP26* разработана высокочувствительная и специфичная иммунохроматографическая тест-система для экспресс-обнаружения противобруцеллезных антител, предназначенная для серологической диагностики бруцеллеза животных. Высокая диагностическая эффективность ИХА определена на 962 испытуемых образцах сывороток крови крупного и мелкого рогатого скота, а также 16 контрольных референс-сыворотках крови.

Финансирование

Работа выполнена по проекту «Разработка технологии производства иммунохроматографической тест-системы для диагностики бруцеллеза на основе рекомбинантных антигенов» в рамках научно-технической программы «Промышленные биотехнологии» на 2014-2016 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Poester F.P., Nielsen K., Samartino L.E., Yu W. Diagnosis of Brucellosis // The Open Veterinary Science Journal. – 2010. – Vol.4. – P. 46-60.
2. Smirnova E., Vasin A., Sandybaev N.T., Klotchenko S., Plotnikova M. Current Methods of Human and Animal Brucellosis Diagnostics // Advances in Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 3. – P. 177-184.
3. Supriya C., Umopathy B., Ravikumar K. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory // Journal of Laboratory Physicians. – 2010. – Vol.2. – P.55-62.
4. Oliveira S.C., Macedo G.C., Almedia L.A., Oliveira F.S., Onate A., Cassataro J., Giambartolomei G.H. Recent Advances in Understanding Immunity Against Brucellosis: Application for Vaccine Development // The Open Veterinary Science Journal. – 2010. – Vol. 4. – P.102-108.
5. Moryon I., Lopez-Goni I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* // Internatl Microbiol. – 1998. – Vol. 1. – P.19-26.
6. Dahouk S.A., Nockler K., Scholz H.C. et al. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella infections* // Journal of Immunological Methods. – 2006. – Vol. 309. – P.34-47.
7. Ko K.Y., Kim J.W., Her M. et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis // Veterinary Microbiology. – 2012. – Vol. 156. – P.374-380.
8. Winter A. Outer membrane proteins of *Brucella* // Ann. Inst. Pasteur Microbiol. – 1987. – Vol. 138. – P.87-90.
9. Whatmore A.M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens // Infect. Genet. Evol. – 2009. – Vol. 9. – P.1168-1184.
10. Dahouk S., Hofer E., Tomaso H. et al. Intraspecies Biodiversity of the Genetically Homologous Species *Brucella* // Appl Environ Microbiol. – 2012. – Vol. 78, №3. – P. 1534-1543.
11. Cassataro J., Pasquevich K., Bruno L. et al. Antibody Reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in Human and Animal Infections by Smooth and Rough Brucellae // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2004. – Vol. 11, №1. – P.111-114.
12. Matar G.M., Khneisser I.A., Abdelnoor A.M. Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a Target Sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* Antigen DNA // Journal of Clinical Microbiology. – 1996. – Vol. 34, №2. – P. 477-478.
13. Ficht T., Bearden S., Sowa B., Adams L. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus* // Infection and Immunity. – 1989. – Vol. 57, №11. – P.3281-3291.
14. Bricker B.J., Tabatabai L.B., Judge B.A. et al. Cloning, Expression, and Occurrence of the *Brucella* Cu-Zn Superoxide Dismutase // Infection and Immunity. – 1990. – Vol. 58, №9. – P. 2935-2939.
15. Tabatabai L.B., Hennager S.G. Cattle Serologically Positive for *Brucella abortus* Have Antibodies to *B. abortus* Cu-Zn Superoxide Dismutase // Clinical and Vaccine Immunology. – 1994. – Vol. 1, №5. – P.506-510.
16. Onate A., Cespedes S., Cabrera A. et al. 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. 4857-4861.
17. Mayfield J., Tabatabai L. Recombinant *Brucella abortus* gene expressing immunogenic protein. United States Patent, №5023174, 1991.
18. Kazak E., Oliveira S.C., Goral G., Akalin H., Yilmaz E., Heper Y., Oral H.B. *Brucella abortus* L7/L12 Recombinant protein Induces Strong Th1 Response in Acute Brucellosis Patients // Iranian journal of immunology. – 2010. – Vol. 7, №3. – P. 132-141.
19. Luo D., Ni B., Li P. et al. Protective Immunity Elicited by a Divalent DNA Vaccine Encoding Both the L7/L12 and Omp16 Genes of *Brucella abortus* in BALB/c Mice // Infection and Immunity. – 2006. – Vol. 74, №5. – P.2734-2741.
20. Cloeckaert A., Baucheron S., Vizcaino N., Zygmunt M.S. Use of Recombinant BP26 protein in Serological Diagnosis of *Brucella melitensis* infection in Sheep // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2001. – Vol. 8, №4. – P. 772-775.
21. Gupta V.K., Kumari R., Vohra J. et al. Comparative evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in goat // Small Ruminant Research. – 2010. – Vol. 93. – P. 119-125.
22. Xin T., Yang H., Wang N. et al. 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.
23. Seco-Mediavilla P., Verger J.M., Grayon M. et al. Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis // Clinical and diagnostic laboratory immunology. – 2003. – Vol.10. – P.647-651.
24. Cloeckaert A., Baucheron S., Vizcaino N., Zygmunt M. Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep // Clinical and diagnostic laboratory immunology. – 2001. – Vol.8. – P.772-775.
25. Liu W., Hu S., Qiao Z. et al. Expression, purification and improved antigenic specificity of a truncated recombinant BP26 protein of *Brucella melitensis* M5-90: a potential antigen for differential serodiagnosis of brucellosis in sheep and goats // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2011. – Vol.58. – P.32-38.

26. Lim J., Kim D., Lee J. et al. Evaluation of recombinant 28kDa outer membrane protein of *Brucella abortus* for the clinical diagnosis of bovine brucellosis in Korea// *J. Vet. Med. Sci.* – 2012. – Vol.74. – P. 687-691.
- 27.Thavaselvam D., Kumar A., Tiwari S. et al. Cloning and expression of the immunoreactive *Brucella melitensis* 28 kDa outer-membrane protein (Omp28) encoding gene and evaluation of the potential of Omp28 for clinical diagnosis of brucellosis// *Journal of Medical Microbiology.* –2010. –Vol. 59, №4. – P.421-428.
- 28.Qiu J., Wang W., Wu J., Zhang H. Characterization of periplasmic protein BP26 epitopes of *Brucella melitensis* reacting with murine monoclonal and sheep antibodies // *PLoS ONE.* – 2012. – №7(3). – P. e34226.
29. Kumar S.,Tuteja U., Kumar A., Batra H. Expression and purification of the 26kDa periplasmic protein of *Brucella abortus* a reagent for the diagnosis of bovine brucellosis // *Biotechnol. Appl. Biochem.* –2008. – №49.– P. 213-218.
30. Hosseini S., AzizpourM., Akbari N., Basiri H. Amplification,cloning and expression of *Brucella melitensis*bp 26 gene (OMP28) isolated from Marcazi and purification of Bp26 protein // *Archives of Razi Institute.* –2013. – Vol.68,№2. –P. 111-116.
31. Kim D., Park J., Kim S., Sox Y. *Brucella* Immunogenic BP26 Forms aChannel-like Structure// *J. Mol. Biol.* – 2013. –№425.–P.1119-1126.
32. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nat. Phys. Sci.* – 1973. – Vol. 241. – 20 p.
33. Hermanson G.T. Preparation of colloidal-gold-labelled-proteins // *London. Bioconjugate Techniques.* Academic Press. – 1996. – 593 p.
34. Bradford M.A. A rapid and sensitive method fer the qvantitation of microgram qvantitaties of protein utilizing the principle of protein – due binding // *Anal. biochem.* – 1976. – Vol. 72, №4. – P. 248-254.
35. Койчубеков Б.К., Сорокина М.А., Букеева А.О. Биостатистика в примерах и задачах. –Алматы, 2012.– 80с.

REFERENCES

1. Poester F.P., Nielsen K., Samartino L.E., Yu W. Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal*, 2010, vol.4, pp. 46-60.
2. Smirnova E., Vasin A., Sandybaev N.T. et al. Current Methods of Human and Animal Brucellosis Diagnostics. *Advances in Infectious Diseases*, 2013, vol. 3, pp. 177-184.
3. Supriya C., Umopathy B., Ravikumar K. Brucellosis: reiew on the recent trends in pathogenicity and laboratory. *Journal of Laboratory Physicians*, 2010, vol. 2, pp. 55-62.
4. Oliveira S.C., Macedo G.C., Almedia L.A. et al. Recent Advances in Understanding Immunity Against Brucellosis: Application for Vaccine Development. *The Open Veterinary Science Journal*, 2010, vol. 4, pp. 102-108.
- 5.Moryon I., Lopez-Goni I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *InternatlMicrobiol*, 1998, vol. 1, pp. 19-26.
6. Dahouk S.A., Nockler K., Scholz H.C. et al. Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella infections*. *Journal of Immunological Methods*, 2006, vol. 309, pp. 34-47.
- 7.Ko K.Y., Kim J.W., Her M. et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Veterinary Microbiology*, 2012, vol. 156, pp. 374-380.
8. Winter A. Outer membrane proteins of *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 1987, vol. 138, pp. 87-90.
9. Whatmore A.M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.*, 2009, vol. 9, pp. 1168-1184.
10. Dahouk S., Hofer E., Tomaso H. et al. Intraspecies Biodiversity of the Genetically Homologous Species *Brucella*. *Appl Environ Microbiol.*, 2012, vol. 78, no. 3, pp. 1534-1543.
- 11.Cassataro J., Pasquevich K., Bruno L. et al. Antibody Reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in Human and Animal Infections by Smooth and Rough Brucellae. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, vol. 11, no. 1, pp. 111-114.
12. Matar G.M., Khneisser I.A., Abdelnoor A.M. Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a Target Sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* Antigen DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, vol. 34, no. 2, pp. 477-478.
13. Ficht T., Bearden S., Sowa B., Adams L. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, 1989, vol.57, no. 11, pp.3281-3291.
14. Bricker B.J., Tabatabai L.B., Judge B.A. et al. Cloning, Expression, and Occurrence of the *Brucella* Cu-Zn Superoxide Dismutase. *Infection and Immunity*, 1990, vol. 58, no. 9, pp. 2935-2939.
15. Tabatabai L.B., Hennager S.G. Cattle Serologically Positive for *Brucella abortus* Have Antibodies to *B. abortus* Cu-Zn Superoxide Dismutase. *Clinical and Vaccine Immynology*, 1994, vol. 1, no. 5, pp. 506-510.
16. Onate A., Cespedes S., Cabrera A. et al. A DNA vaccine encoding Cu-Zn Superoxide Dismutase of *Brucella abortus* induced protective immunity in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, 2003, vol. 71, no. 3, pp. 4857-4861.
17. Mayfield J., Tabatabai L. Recombinant *Brucella abortus* gene expressing immunogenic protein. *United States Patent*, no. 5023174, 1991.

18. Kazak E., Oliveira S.C., Goral G. et al. *Brucella abortus*L7/L12 Recombinant protein Induces Strong Th1 Response in Acute Brucellosis Patients. *Iranian journal of immunology*, 2010, vol. 7, no. 3, pp. 132-141.
19. Luo D., Ni B., Li P. et al. Protective Immunity Elicited by a Divalent DNA Vaccine Encoding Both the L7/L12 and Omp16 Genes of *Brucella abortus* in BALB/c Mice. *Infection and Immunity*, 2006, vol. 74, no. 5, pp. 2734-2741.
20. Cloeckaert A., Baucheron S., Vizcaino N., Zygmunt M.S. Use of Recombinant BP26 protein in Serological Diagnosis of *Brucella melitensis* infection in Sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2001, vol. 8, no. 4, pp. 772-775.
21. Gupta V.K., Kumari R., Vohra J. et al. Comparative evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in goat. *Small Ruminant Research*, 2010, vol. 93, pp. 119-125.
22. Xin T., Yang H., Wang N. et al. Limitations of the BP26 Protein-Based Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Brucellosis. *Clinical and vaccine immunology*, 2013, vol. 20, no. 9, pp. 1410-1417.
23. Seco-Mediavilla P., Verger J.M., Grayon M. et al. Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 2003, vol. 10, pp. 647-651.
24. Cloeckaert A., Baucheron S., Vizcaino N., Zygmunt M. Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 2001, vol. 8, pp. 772-775.
25. Liu W., Hu S., Qiao Z. et al. Expression, purification and improved antigenic specificity of a truncated recombinant BP26 protein of *Brucella melitensis* M5-90: a potential antigen for differential serodiagnosis of brucellosis in sheep and goats. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2011, vol. 58, pp. 32-38.
26. Lim J., Kim D., Lee J. et al. Evaluation of recombinant 28kDa outer membrane protein of *Brucella abortus* for the clinical diagnosis of bovine brucellosis in Korea. *J. Vet. Med. Sci.*, 2012, vol. 74, pp. 687-691.
27. Thavaselvam D., Kumar A., Tiwari S. et al. Cloning and expression of the immunoreactive *Brucella melitensis* 28 kDa outer-membrane protein (Omp28) encoding gene and evaluation of the potential of Omp28 for clinical diagnosis of brucellosis. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, vol. 59, no. 4, pp. 421-428.
28. Qiu J., Wang W., Wu J., Zhang H. Characterization of periplasmic protein BP26 epitopes of *Brucella melitensis* reacting with murine monoclonal and sheep antibodies. *PLoS ONE*, 2012, no. 7(3), pp. e34226. doi:10.1371.
29. Kumar S., Tuteja U., Kumar A., Batra H. Expression and purification of the 26kDa periplasmic protein of *Brucella abortus* a reagent for the diagnosis of bovine brucellosis. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2008, no. 49, pp. 213-218. doi 10.1042/BA20070.
30. Hosseini S., Azizpour M., Akbari N., Basiri H. Amplification, cloning and expression of *Brucella melitensis* bp 26 gene (OMP28) isolated from Marcazi and purification of Bp26 protein. *Archives of Razi Institute*, 2013, vol. 68, no. 2, pp. 111-116.
31. Kim D., Park J., Kim S., Sox Y. *Brucella* Immunogenic BP26 Forms a Channel-like Structure. *J. Mol. Biol.*, 2013, no. 425, pp. 1119-1126. doi.org/10.1016/j.jmb.2013.01.015.
32. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.*, 1973, vol. 241, 20 p.
33. Hermanson G.T. Preparation of colloidal-gold-labelled-proteins. *London. Bioconjugate Techniques. Academic Press*, 1996, 593 p.
34. Bradford M.A. 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.
35. Koichubekov B.K., Sorokina M.A., Bukeeva A.O. Biostatistics in examples and problems. – Almaty, 2012. – 80 p.

РЕКОМБИНАНТТЫ АНТИГЕН НЕГІЗІНДЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЯЛЫҚ ТЕСТ-ЖҮЙЕСІН БРУЦЕЛЛЕЗДІ СЕРОЛОГИЯЛЫҚ БАЛАУДА ҚОЛДАНУ

Манат Е., Сарина Н.Ы., Ескендірова С.З., Шустов А.В., Мұқанов Қ.Қ.

Ұлттық биотехнология орталығы

Ш. Уалиханов к-сі, 13/1, Астана, 010000, Қазақстан

bionis_ns@mail.ru

ТҮЙІН

Қазақстан Республикасының тәжірибелік ветеринарлық қызметі мен ғылыми потенциалдың бірлескен күшімен қол жеткізген жетістіктеріне қарамастан, жануарлардың бруцеллезін жою мәселесі толығымен шешілген жоқ. Адамдардың бруцеллезбен ауырып-сырқаттануының тұрақты жоғары деңгейі эпизоотиялық жағдайдың шиеленісіне негізделген және бұл инфекцияның жалпы инфекциялық патологиясының құрылымының ерекше маңыздылығын үлкен әлеуметтік-экономикалық зияндылығын анықтайды. Бруцеллезді балайтын серологиялық әдістердің телімділігі мен

сезімталдылығын жоғарылату мүмкіндігінің бірі, қазіргі уақытта зерттелінген және спектрі толық анықталған, патогенді бруцеллалардың иммунодоминантты ақуыздарының рекомбинантты аналогын қолдану болып табылады. *BP26* периплазматикалық ақуызы *Brucella* барлық туысы үшін консервативтілігі жоғарытелімді антиген болып табылады, және медицина мен ветеринарияда пайдалану үшін бруцеллезге иммуноферментті және иммунохроматографиялық тест-жүйесін әзірлеу үшін қолдануда балаулық құндылығы өте жоғары.

Бруцелланың *BP26* рекомбинантты антигені негізінде бруцеллезге қарсы антиденелерді жедел-анықтау үшін, жануарлардың бруцеллезін серологиялық балау үшін арналған телімділігі мен сезімталдылығы жоғары иммунохроматографиялық тест-жүйесі әзірленді. ИХТ жоғары балаулық тиімділігі ұсақ және ірі қара малдардың 962 қан сарысуының зерттеу үлгілерінде, сонымен қатар 16 бақылаулық референс-қан сарысуларында анықталды.

Негізгі сөздер: иммунохроматографиялық тест-жүйесі, рекомбинантты антиген, қан сарысуы, антидене.