



ӘОЖ 619

## БРУЦЕЛЛАЛАРДЫҢ МУЛЬТПРОТЕИНДЕРІН ДАЙЫНДАУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ ИММУНОРЕАКТИВТІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

Іңірбай Б.Қ., Сыздыкова А.С., Курмашева А.К., Бұлашев А.Қ.

*С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті  
Жеңіс даңғылы, 62, Нұр-Сұлтан қаласы, 010011, Қазақстан*

### ТҮЙІН

Жануарлардың бруцеллезін диагностикалау үшін негізінен Роз-Бенгал сынамаcы, комплементті байланыстыру реакциясы және агглютинация реакциясы қолданылады. Бұл реакциялардың сезімталдылығы мен телімділігі жеткіліксіз деңгейде болғандықтан бруцеллез індетімен күресудің тиімділігіне кері әсерін тигізіп отыр. Сезімталдығы жоғары заманауи серологиялық сыналымдарды қолдану *Brucella* тұқымдасының бактерияларына тән антигендердің болуын талап етеді. Жұмыстың негізгі мақсаты ретінде рекомбинантты ДНҚ технологиясы әдісімен қоздырғыштың мультипротеиндерін алу және олардың антигендік қасиеттерін зерттеу болып анықталды. Жұмысты жүзеге асыру барысында *B. abortus* және *B. melitensis*-тің сыртқы мембраны ақуыздарының құрамына кіретін диагностикалық маңызы бар пептидтерден құрастырылған мультипротеиндердің үш түрі дайындалды. Қолданылған мақсатты өнімдер өндіруші штаммымен табиғи түрінде синтезделініп, тышқандарға иммуногенді болды. Мультипротеиндерге қарсы өндірілген антиденелер патогеннің жасуша қабырғасының жекеленген ақуыздарына қатысты телімділігін көрсетті. Алынған нәтижелер иммунды-фермент талдауында мультипротеиндерді антиген ретінде қолдана отыра, *Brucella*-ға тән антиденелерді үй жануарларының қан сары суларында анықтау мүмкіндігін зерттеуге арналған жұмыстарды жалғастыру қажеттілігін көрсетеді.

Түйінді сөздер: *Brucella* spp., сыртқы мембрана ақуызы, антиген, серологиялық диагностика.

### КІРІСПЕ

Бруцеллез әлемдегі кең таралған зоооздардың бірі болып табылады және Жерорта теңізі өңірі, Таяу Шығыс, Африка, Латын Америкасы және Азия елдері медицина және ветеринария ғылымдарының өзекті проблемаларының біріне айналып отыр [1]. Ауру сауда шектеулерін тудыру арқылы мал шаруашылығының дамуына кедергі жасап, үлкен экономикалық шығындарға әкелуде [2]. Адамдар ауру жануарларды күтіп-бағу кезінде және олардың алынған сүт өнімдерін тұтынған кезде індетті жұқтырып алуы мүмкін. Әлем бойынша жыл сайын шамамен 500 000-нан астам адам бруцеллез ауруына шалдығады екен. Өкінішке орай, Қазақстан Республикасы (ҚР) адамдардың бруцеллезбен сырқаттануы бойынша алдыңғы 25 елдің қатарына кіріп отыр [3].

Бруцеллезге қарсы іс шаралардың төмен тиімділігінің негізгі себептерінің бірі - ауруды балауда қолданылатын серологиялық реакциялардың сезімталдығы мен телімділігінің жеткіліксіздігі болып табылады. ҚР-ында ірі қара малдың (ІҚМ) бруцеллезін тірі кезінде балау үшін комплементті байланыстыру реакциясы

(КБР), роз-бенгал сыналымы (РБС) және агглютинация реакциясы (АР) қолданылады. Сонымен қатар, Жануарлар денсаулығын сақтаудың дүниежүзілік ұйымы ұсынған флюоресцентті-поляризациялық талдау (ФПТ) және иммунды-фермент тәсілі (ИФТ) де қолданыс табады. Бұл сыналымдардағы антиген - бруцелланың жасуша қабырғасының S-ЛПС болып табылады, ал бұл компоненттің эпитоптары бруцеллалармен туыстас патогендермен айқыш (кросс)-реакцияларға түсетін антиденелерді түзей алады [4].

Қазақстанда 2008-2013 жылдар аралығында бруцеллездің серодиагностикасында ИФТ-ін қолданудың сәтсіз оқиғасы орын алды. Аталмыш кезеңде вакцинаны қолдану тоқтатылды да, індетпен күресудің негізгі әдісі болып ИФТ-інде оң нәтиже берген серопозитивті жануарларды союға жіберу тәсілі анықталды («*test and slaughter*»). ИФТ/ЛПС бойынша бруцеллезге оң реакция берген ІҚМ саны аталмыш сыналымды енгізгеннен кейін бір жылдан соң 2007 жылмен салыстырғанда орта есеппен 7,3 есеге өсті, алайда эпизоотиялық жағдайдың жақсаруы байқалмады [5]. Бұл мәліметтер осы кезеңде коммерциялық ИФТ жиынтықтарында полисахаридті антигендерді қолдануына байланысты көптеген сау жануарлар серопозитивті деп танылып, пышаққа ілінгендігін көрсетелі. Бұл жағдай дәстүрлі серологиялық реакцияларға және вакцинацияға қайта оралу туралы шешім қабылдауға түрткі болды. Сәтсіз аяқталған шара жоғары сезімтал тест болып табылатын ИФТ-ді ауру қоздырғышына тән телімді антиген табылғанда ғана бруцеллездің диагностикасында қолдануға болатындығын көрсетті. Мұндай полисахаридтік емес антигендерді іздестіру мәселелері вакциндік препараттар және заманауи диагностикалық жиынтықтарды әзірлеумен айналысатын зерттеушілердің назарында болып отыр [6]. Бүгінгі күні *Brucella* жасушаларына айқыш реакциялардың туындауын азайтатын антигендер қатарына ақуыздар, соның ішінде сыртқы мембрана ақуыздары (СМА) айтылып жүр. Гендік инженерияның жетістіктері *Brucella* бактерияларының рекомбинантты СМА-дарының (рСМА) диагностикалық құндылықтарын зерттеуге жаңа мүмкіндіктер ашып отыр, өйткені бұл технология қоздырғыштармен жұмыс жасауды және биологиялық қауіпсіздік шараларын сақтауды қажет етпейді. Дегенмен, жекеленген рекомбинантты ақуыздар, мысалы, рСМА31 [7,8], рСМА28 [9], рСМА25 және / немесе рСМА31 [10] ИФТ-нің телімділігін қамтамасыз еткенімен, оның сезімталдығын айтарлықтай төмендететіндігі белгілі болды. АР бойынша оң нәтижелі қансарысуы үлгілерін ИФТ-інде рСМА10, 19 және 28-дің қоспасымен тексерген кезде талдаудың сезімталдығын едіуір көтерген [11]. Үш ақуыздың (рСМА25, 28 және 31) кешеніне негізделген ИФТ, тышқан моделінде *B. melitensis* вирулентті штамына қарсы алынған антиденелерді вакциналық және кросс-реактивті антиденелерден ажыратуға мүмкіндік берген [12]. Дегенмен бұл үміт күттіретін нәтижелер үй жануарларында расталған жоқ. Біздің алдыңғы зерттеулеріміз көрсеткендей, рСМА19, 25 және 31-лерге телімді антиденелер *B. abortus* 19 вакцинациясымен қайтара егілген малда 10 ай бойы анықталуы мүмкін [13]. Ал, ИФТ-інде жекеленген рСМА-дарды қолдану сыналымның сезімталдығының төмендеуіне әкелді. Бұл нәтижелер вакцинация алдында ауру қашарларды толыққанды анықтауға мүмкіндік беретін сезімтал ИФТ жиынтығын әзірлеу үшін рСМА-ының құрамасын қолдану қажет деген болжам жасауға негіз болды. Демек, бруцелланың бірнеше СМА-ының диагностикалық маңызды аймақтарынан құралатын және бір өндіруші-штаммен синтезделетін антиген сыналымның дәлділігін және диагностикалық жиынтықтың салыстырмалы түрде арзан болуын қамтамасыз етуі тиіс. Осыған орай, жұмыстың мақсаты бруцелланың мультипротеинді антигенін әзірлеу және оның иммунореактивтілігін зерттеу болып анықталды.

## Материалдар мен әдістер

*Зертханалық жануарлар.* Зерттектерімізде Нұр-Сұлтан қ. С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің (ҚазАТУ) зоогигиеналық талаптарға сай келетін виварийінде күтілген 60 зертханалық еркек тышқандар қолданылды. Жануарларға жасалатын тәжірибелер ҚазАТУ Ветеринария және мал шаруашылығы технологиясы факультетінің этика бойынша комитетімен мақұлданды және зертханалық жануарларға күтім жасау жөніндегі нұсқаулыққа сәйкес орындалды: Зертханалық кеміргіштер мен қояндарға жағдай жасау және күтіп бағу ережелері халықаралық стандартқа МЕМСТ 33216-2014) сәйкес болды.

*Бактериалдық итамдар, плазмидалар және қоректік орталар.* Жұмыс барысында *E. coli* DH5 $\alpha$  және BL21 (DE3) (Novagen, АҚШ), сонымен қатар pGEM-TEasy (Promega, Medison, АҚШ) және pET28 (Novagen, АҚШ) плазмидалары қолданылды. Жасуша культураны ампициллин және/ немесе канамицинді бар (100 мкг / мл және 50 мкг / мл сәйкесінше) (Синтез, Курган, Ресей) Луриа Бертани (ЛБ) және ЛБ агарлық ортасында өсірдік (Thermo Fisher Scientific, Waltham, АҚШ).

*Генетикалық конструкцияның дизайны.* Бруцелланың СМА19 [14], СМА25 [15] және СМА31 [16] ақуыздарының антигендік және иммуногендік қасиеттерін зерттеген жұмыстардың нәтижелерінің негізінде аталған ақуыздардың иммунодоминантты бөлшектері таңдалып алынды. Таңдалған ақуыз фрагменттерінің амин қышқылдық тізбегін анықтау NCBI PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) мәліметтер базасын қолдану арқылы жүргізілді. Биоақпараттық талдау Vector NTI 11.5 (Invitrogen, АҚШ) бағдарламалық пакетін қолдану арқылы жүзеге асты. Рекомбинантты ақуыздарды тиімді түрде синтездей үшін *E. coli* K12 экспрессия жүйесіне арналған нуклеин қышқылдары тізбектерінің кодондары оңтайландырылды. Гендердің нуклеотидтік тізбектерінің негізінде СМА 25/19, СМА 19/31, және СМА 25/31 *Brucella* spp. мультипротеиндерінің синтезіне жауап беретін геннің генетикалық конструкциясы дайындалды.

*Гендердің синтезі.* Бруцелла ақуыздарының таңдалған фрагменттерінің гибридті гендерін Macrogen (Сеул, Оңтүстік Корея) фирмасы синтездеді. Әрбір генде рестрикциялар сайттары және 5'-соңында 6 гистидинді кодондар (6His-tag) болды.

*Клонирлеу, экспрессия және химерлік рекомбинантты ақуыздарды тазалау.* ДНҚ препаративті мөлшерін алу үшін үш геннің әрқайсысымен *E. coli* DH5 $\alpha$  штамы трансформацияланды және олардың нуклеотидтік тізбегі анықталды. ЛБ агарда өсірілген бактериалдық жасушаларға Тақ полимераза (Thermo Fisher Scientific, Waltham, АҚШ) және M13 (Promega, Medison, АҚШ) праймерлерінің көмегімен ПТР талдау жасалынды. Оң клондар ДНҚ тазалау және секвенирлеу үшін қолданылады. Секвенирлеуді BigDye Terminator (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) реагенттерінің жиынтығымен жүргізілді. Алынған гендерді EcoRI және XhoI рестрикция сайттарымен pET28 плазмидасына клондадық. Компетентті *E. coli* (DE3) электропорация жолымен (MicroPulser, Bio-Rad, АҚШ) енгізілген гендері бар pET-28 плазмидті векторларымен трансформацияланды (100 нг плазида, 50 мкл жасушалық суспензия, 2,5 кВ, 25 мкФ және 200 Ом). Электропорация ұзақтығы 5,0 мс құрады. Трансформацияланған жасушаларды (37°C, 1 сағ) 950 мкл супероңтайлы сорпада (Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва) 150 айн / мин жылдамдықта шайқау арқылы инкубирледік. Содан соң 50 мкл жасушаны селективті антибиотик ретінде канамицинді бар ЛБ агарға егіп, 16 сағат бойына 37°C өсірдік. Жеке трансформант колонияларды канамицинді бар ЛБ

сорпасында өсірдік. Бактерияның логарифмдік өсу фазасының ортасында ( $\lambda = 600$  нм сіңіруінде, OD 600 = 0,6) сорпаға 0,1М индуктор - изопротил- $\beta$ -D-1-галактопиранозид (ИПТГ) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, АҚШ) қостық, культураны шайқау арқылы инкубирледік (бөлме температурасы, 16 сағ). Бактериалдық жасушаларды  $6000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 7 мин центрифугалау арқылы тұнбаға түсірдік.

*Бактериалдық жасушалардың лизисі және мақсатты ақуыздарды хроматографиялық тазалау.* Бактериалдық жасушаларды Omni Ruptor 4000 (Omni International, Georgia, АҚШ) мұзды буферде 24 кГц (20 мМ NaCl, 20 мМ HEPES және 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид, рН 7,5) лизиске ұшыраттық. Рекомбинантты ақуыздарды металхелатты хроматографиямен (Ni<sup>2+</sup>) HisTrap™ HP 1 мл көлемдегі колонкасын қолдана отыра (GE Healthcare, АҚШ) тазаладық. Ол үшін рекомбинантты ақуыздары бар ерімейтін ақуыз агрегаттарын центрифугалау арқылы тұндырып, супернантантты алып тастадық. Тұнбаны буферде еріттік (20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 8 М мочеви́на, 500 мМ NaCl) және ультрадыбыспен қайтадан өңдедік. Ерімеген материалды центрифугирлеу арқылы жинап, алып тастадық. Ақуыз ерітіндісін Ni-NTA (никель-нитрилотрисірке қышқылы) колонкасына енгіздік және сол буфермен теңестірдік. Колонканы теңестіретін буфердің (20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 8 М мочеви́на; 500 мМ NaCl; 20 мМ имидазол) 10 көлемімен шайдық. Хроматографиялық колонкадан рекомбинантты ақуыздарды соңғы элюирленуі үшін имидазолдың (20–500 мМ) сызықтық градиентін қолдандық. Ақуыздарды тазалау үшін жедел сұйықтық ақуыздық хроматографияны пайдаландық. Ақуыздық фракцияларды  $\lambda = 280$  нм анықтадық.

*Додецил сульфат натрий бар полиакриламидтегі гелдегі (ПААГ-ДСН) және иммуноблот.* рСМА25/19, рСМА19/31 және рСМА25/31 тазартылған мультипротеиндер электрофорезін 12% ПААГ-ДСН жүргіздік. Иммуноблот өткізу үшін электрофорезден кейін жұптасқан ақуыз үлгілерін нитроцеллюлозды мембранаға ауыстырылды (GE Healthcare Life Sciences, UK). Содан соң, беткейдің бос жатқан аймақтары 1% бұқаның альбумин сарысуымен (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, АҚШ) 1 сағат  $37^\circ\text{C}$  инактивтендірілді және Твин-20 (ЗФЕ-Тв) физиологиялық буфермен шайылды. Осыдан кейін мембрананы *V. abortus* 544 (1:100) арнайы жұқтырылған сиырдың қансарысуында 1 сағат  $37^\circ\text{C}$  ұстадық. ЗФЕ-Тв шаю үрдісінен кейін мембрананы пероксидазамен (JacksonImmunoResearch, WestGrove, АҚШ) таңбаланған антигүрлік антиденелердің жұмыс ерітіндісіне ауыстырдық (1 сағат  $37^\circ\text{C}$ ). Иммуноблот нәтижелерін фермент субстраты және хромоген - 4-хло-1-нафтол көмегімен (Sigma-Aldrich, St.Louis, АҚШ) анықтадық.

*Қан сарысулары.* Бруцеллалардың гибриді ақуыздарына қарсы тышқан сарысуларын келесі жолмен алдық. Әрқайсысы 10 тышқаннан құралған үш топтағы әрбір жануардың тері астына екі рет рСМА19/25, рСМА19/31 және / немесе рСМА25/31-тің 25 мкг ектік. Иммунизацияның бірінші күні ақуыздарды толымсыз адьювант Фрейдпен бірдей көлемде (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Германия), ал 14 күні – ЗФЕ-мен (рН 7,2-7,4) енгіздік. Қанды 28 күні құйрық тамырынан алдық. Центрифугирлеуден кейін бөлінген сарысулар иммуногендерге және сонымен қатар жеке ақуыздарға қарсы (рСМА19,25 және/немесе 31) бағытталған антиденелердің титрін ИФТ-інде анықтау үшін қолданылады. Бақылау тобы ретінде егілмеген 10 тышқан алынды.

Құрамында бес-бестен тышқандары бар үш топ бруцелланың жеке рСМА-ына қарсы антисарысу алу үшін пайдаланылды. Әрбір тышқанды рСМА19 (I топ), рСМА25 (II топ) және рСМА31 (III топ) ақуыздарының 25 мкг-ымен жоғарыда айтылған тәсілге сәйкес иммундедік. Теріс бақылау тобы ретінде ешбір екпе алмаған 5 тышқан қолданылды.

*Жанама ИФТ-інде (ж-ИФТ) мультипротеиндердің иммуногенділігін анықтау.* Полистиролды планшеттің ұяшықтарына (ThermoFisherScientific, Waltham, MA, АҚШ) рСМА19/25, рСМА19/31 және/немесе рСМА12/31-дің 1,0 мкг / мл-ін рН 9,6 болатын бикарбонатты буферді қолдана отыра отырғыздық және 4°C түнге қалдырдық. Имунделген тышқандардың қан сарысуы үлгілерін аттас ақуыздармен көмкерілген 8 ұяшыққа ЗФЕ-Тв ерітіндісін қолдана отыра 1:100 сұйылтынымынан бастап еселедік. Планшетті 37°C 1 сағат бойына ұстадық. Антиген-антидене кешенін пероксидазамен (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, АҚШ) таңбаланған антитүрлік антиденелермен анықтадық. Оң нәтиже ретінде 10 бас бақылау тышқандары сарысуларының ИФТ-дағы 1: 100 сұйылтынымдарындағы оптикалық тығыздығының (ОТ) орташа мәніне оладың 3 еселенген статистикалық ауытқуларынан асатын ОТ көрсеткіштері алынды.

*Мультипротеиндердің антигенділігін жекеленген рСМА қарсы антисарысуларында анықтау.* ИФТ арналған планшет ұяшықтарына мультипротеиндерді отырғыздық та, рСМА19, 25 және/немесе 31-ге қарсы тышқан сарысуларын жоғарыла көрсетілгендей сұйылттық. Қатты фазада байланысқан антиденелерді, пероксидазамен-конъюгирленген (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, АҚШ) тышқанның IgG қарсы қоян антиденелерінің көмегімен анықтадық. Оң нәтиже ретінде 5 бас бақылау тышқандары сарысуларының ИФТ-дағы 1: 100 сұйылтынымдарындағы оптикалық тығыздығының (ОТ) орташа мәніне оладың 3 еселенген статистикалық ауытқуларынан асатын ОТ көрсеткіштері алынды.

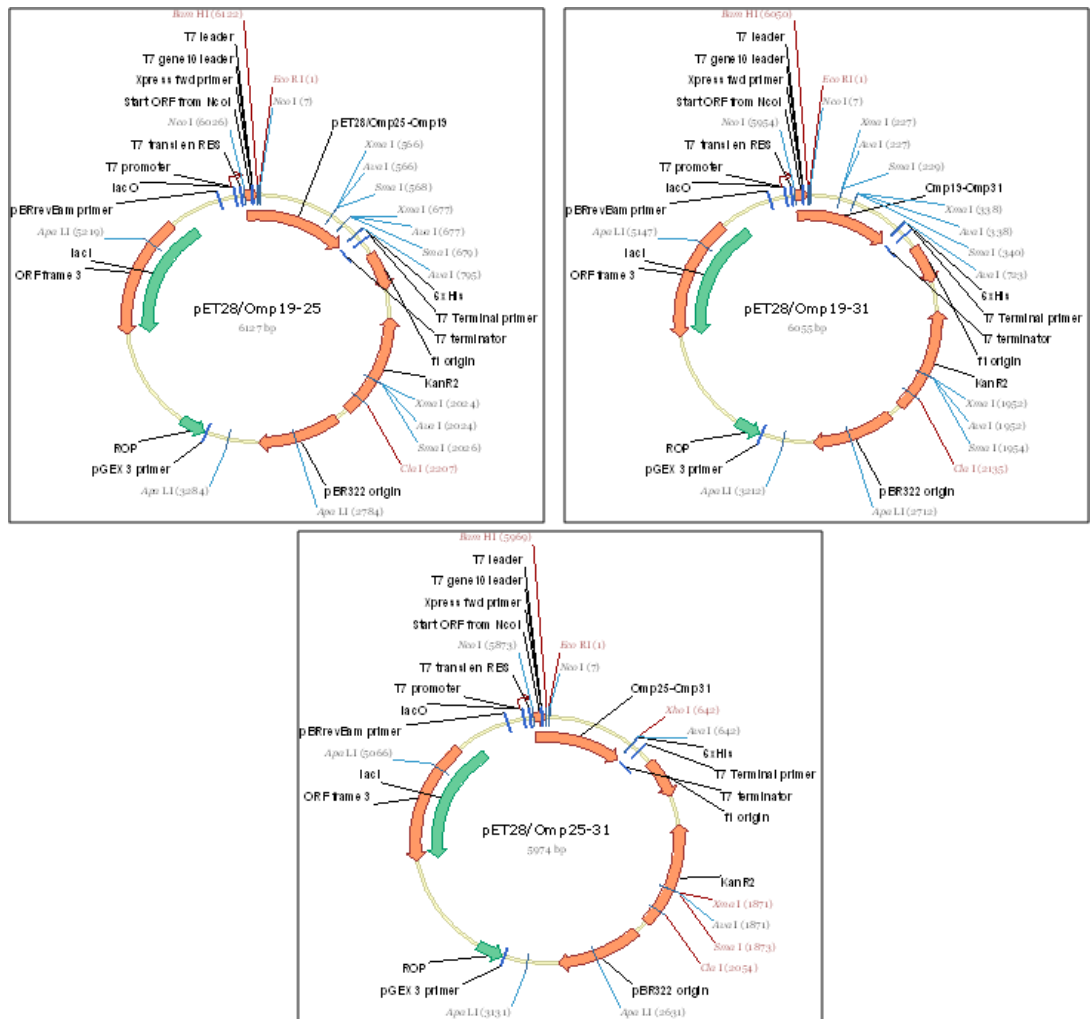
*Жекеленген рСМА-дың антигенділігін бруцеллалардың мультипротеиндеріне қарсы тышқан антисарысуларында анықтау.* Қысқа қайырғанда, рСМА19, 25 және / немесе 31-мен сенсibiliзденген планшет ұяшықтарына жоғарыда жазылғандай бруцеллалардың мультипротеиндеріне қарсы антисарысулардың сұйылтынымдарын дайындадық. Оң нәтиже ретінде 5 бас бақылау тышқандары сарысуларының ИФТ-дағы 1: 100 сұйылтынымдарындағы оптикалық тығыздығының (ОТ) орташа мәніне оладың 3 еселенген статистикалық ауытқуларынан асатын ОТ көрсеткіштері алынды. ИФТ-інде қансарысуының барлық үлгілері үш рет қайталана зерттелінді.

*Статистикалық талдау.* Зерттеуге алынған қан сарысуы ОТ-ның (ОТз) бақылау қан сарысуы ОТ-на (ОТб) қатынасын (ОТз/ОТб) анықтайтын көрсеткіштердің араларындағы айырмашылықтардың сенімділік деңгейі Стьюденттің t-критериясын қолдану арқылы анықталды. Антидене титрлерінің статистикалық талдауын жалпыға белгілі әдіс бойынша жүзеге асырдық [22]. Салыстырылып отырған көрсеткіштердің айырмашылықтары Р <0,05 деңгейінде қабылданды.

## **ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ**

Гендердің нуклеотидтік тізбектерінің негізінде СМА25/19, СМА19/31 және СМА25/31 комбинациялары дайындалынып, бруцелланың аталмыш мультипротеиндерінің синтезіне жауапты 3 химерлік генетикалық конструкция жасалынды. Генетикалық конструкциялардың сұлбасы 1 суретте көрсетілген.





**Сур.1.** CMA19 / 25, CMA19 / 31 және CMA25 / 31 *Brucella* spp. жұптастырылған генетикалық құрылымдары

1 кестеде 3 түрлі варианттағы геннің нуклеотидтік тізбегі көрсетілген.

**Кесте 1.** pCMA25/19, pCMA19/31 және pCMA25/31 мультипротеиндер гендерінің нуклеотидтік тізбегі

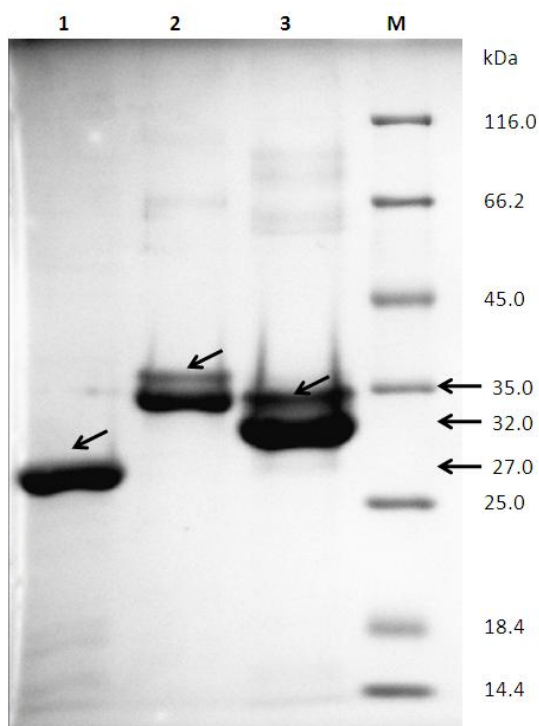
Мульти про-теиндер	Нуклеотидтік тізбектер
pCMA25/19	<p><u>BamHI EcoRI NcoI</u></p> <p>cggatccgaattcccatggcatgggcgaaaaaagcaaatggcctggaagtgaacaggg  ctttgaaggcagcctgcgcgcgcgtgggctatgatctgaaccggatgacccgatctgaccgcgg  gattgcccggcagcagattaaactgaacaacggcctggatgatgaaagcaatttcgctgggctg  gaccgcccgcggcctggaagcgaactgaccgataacattctgggccgcgtggaatcgcctat  accagtatggcaaaaaactatgatctggcgggcaccaccgtgcgcaaaaactggataccag  atttcgctgggcattggctataaattctggcgggctgccagagcagccgctgggcaacctggata  acgtgagcccgcgccgccggcgccgggtgaacgcggtgccggcgggcaccgtgcagaaag  gcaactggatagcccaccagttccgaacgcgccgagcaccgatatgagcgcgagagcggc  accaggtggcagcctgccggcgagcgcgccgatctgacccgggcgcggtggcggggc  tgtggaacgcgagcctgggcggccagactgcaaatgacccccgagaccaaatatggccagg  gctatcgcgcggcccgcgtgcccgggcgaactggcgaacctggcagctgggcggtgaac</p>



	<p>ggcaaacagctggtgctgtatgatgcg _____<u>6His-tag</u>_____ <u>Xho1</u></p> <p>aacggcggcaccgtggcgagcctgtatagccatcatcatcatcattaactcgagcc</p>
<p>pCMA 19/31</p>	<p><u>BamH1 EcoR1 Nco1</u></p> <p>cggatccgaattcccatggcactggcgggctgccagagcagccgctgggcaacctggataa cgtgagcccgccgccgccgccggcgccgggtgaacgcggtgccggcgggcaccgtgcagaaagg caacctggatagcccgaccagtttccgaacgcgccgagcaccgatatgagcgcgagagcggcac ccagggtggcgagcctgccgccggcgagcgcgccggatctgacccgggcgcggtggcgggctg tggaacgcgagcctggcgggccagagctgcaaaattgcacccgcagaccaaataatggccaggg ctatcgcgcgggcccgtgcgctgccggggcgaactggcgaacctggcgagctggcggtgaacg gcaaacagctggtgctgtatgatcgcaacggcggcaccgtggcgagcctgtatagcaaacggaaa cctaaagtggaatggtttggcaccgtgcgcgcgcgctgggctataaccgcgaccgaacgcctgatggt gtatggcaccggcgccctggcgatggcaagtgaagcgcgttaacctgggcatgatgcgagc gcgctgcatacctggagcgataaaaccaaagcgggctggaccctggcgcgggcgcggaatatgc gattaacaacaac _____<u>6His-tag</u>_____ <u>Xho1</u></p> <p>atggaccctgaaagcgaatatctgtataccgatctgggcaaacgccatcatcatcatcatta ctcgag</p>
<p>pCMA 25/31</p>	<p><u>BamH1 EcoR1 Nco1</u></p> <p>cggatccgaattcccatggcatggcgcaaaaaagcaaatggcctggaagtgaacaggg ctttgaaggcagcctgcgcgcgcgctgggctatgatctgaaccggatgccgtatctgaccgcgg gcattgcgggagccagattaaactgaacaacggcctggatgatgaaagcaaatctcgcgtgggctg gaccgcggcgcgggcctggaagcgaactgaccgataacattctgggcccgcgtggaatcgtctat accagtatggcaaaaaactatgatctggcgggaccaccgtgcgcaaaaactggataaccagg atcttcgctgggcatgtgctataaattaaagcggaaacaaagtggaatggtttggcaccgtgcgcg cgcgcctgggctataaccgcgaccgaacgcctgatggtgtatggcaccggcgccctggcgatggca aagtgaagcgcgttaacctggcgatgatgcgagcgcgctgcatacctggagcgataaaacaa agcgggctggaccctggcgcgggcgcggaatatgcgattaacaacaactggaccctgaaaagcg aatatctgtatac _____<u>6His-tag</u>_____ <u>Xho1</u></p> <p>cgatctgggcaaacgccatcatcatcatcattaactcgagcc</p>

Мультипротеиндердің ДНК фрагменттерін гельден тазартып, экспрессиялаушы векторларға лигирлендіріп (енгізіп) және *E. coli* BL21 (DE3) жасушаласына трансформациялады. Бактерия жасушалары ЛБ қоректік ортасында өсіріліп, мақсатты ақуыздың экспрессиясы ИПТГ қосу арқылы индукцияланды.

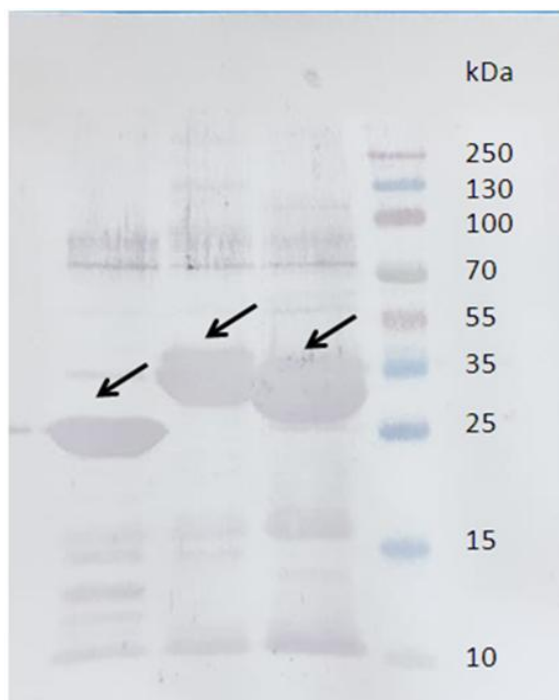
Металлхелатты афинді хроматография арқылы тазартылған pCMA 25/31, pCMA19/25 және pCMA19/31 мультипротеиндері ПААГ-ДСН электрофорезінде сәйкесінше 27кДа, 35кДа және 32кДа молекулалық салмаққа ие екендігін көрсетті (2-сурет).



1-ші жолақ: pCMA25/31; 2-ші жолақ: pCMA19/25; 3-ші жолақ: pCMA19/31;  
M: маркер.

**Сур. 2.** *E. coli* BL21 өндірген бруцеллез мультипротеиндерінің ПААГ-ДСН электрофозі

Мультипротеиндердің *Brucella* тұқымдасына жататын бактерияларға тән антигенділігі бруцеллезбен арнайы жұқтырылған сиырдың қан сарысуын қолдану арқылы иммуноблот тәсілінде дәлелденді (сурет 3).



1-ші жолақ: pCMA25/31; 2-ші жолақ: pCMA25/19; 3-ші жолақ: pCMA19/31;  
M: маркерлер



**Сур. 3.** *B. abortus* 544 вирулентті штамымен жұқтырылған сиырдың иммунды қансарысуымен мультипротеиндерді иммуноблот көмегімен анықтау

3 суреттен көргеніміздей, бруцеллезбен жұқтырылған сиырдың қан сарысуындағы антиденелер *Brucella*-ның зерттеуге алынған үш рекомбинантты мультипротеиндерінің ақуыздық жолақтарымен әрекеттесіп, бұл антигендердің бруцеллез қоздырғышына тән екендігін дәлелдеп отыр.

Мақсатты ақуыздардың антигенділігі бруцеллалардың мультипротеинді антигендерінің құрамына енетін жекеленген рСМА-ға қарсы алынған тышқан қан сарысуларын қолдана отыра да зерттелінді (2 кесте).

**Кесте 2.** *Brucella* мультипротеиндерінің анти-рСМА антиденелеріне телімділігі

Тышқан сарысуларының түрлері					
анти-рСМА19		анти-рСМА25		анти-рСМА31	
ж-ИФТ қолданылған антигендер					
рСМА2 5/19	рСМА1 9/31	рСМА2 5/31	рСМА2 5/19	рСМА1 9/31	рСМА2 5/31
Антиденелердің орташа титрі					
1:120 (+7,2%; -6,7%)	1:230 (+7,2%; -6,7%)	1:230 (+7,2%; -6,7%)	1:200 (+15,7 %; -13,5%)	1:370 (+24,0 %; -19,7%)	1:230 (+7,2%; -6,7%)
ОТз/ОТб орташа көрсеткіштері					
2,77±0, 21	3,65±1, 20	2,74±0, 15	3,00±0, 47	2,48±0, 12	2,37±0, 10

2 кестедегі деректер мультипротеиндерді құрастыруда қолданылған жекеленген рСМА фрагменттері өздерінің антигенділігін сақтап қалғандығын дәлелдейді, себебі рСМА19, рСМА25 және рСМА31-ге қарсы антиденелер жұпталған антигендердің құрамындағы өздерінің фрагменттерімен байланысқа түсіп отыр. Антиденелер титрі бойынша антисарысулар бір-бірінен статистикалық тұрғыдан ерекшеленбеді.

Мультипротеинді антигендер тышқан моделінде өздерінің иммуногенділігін көрсетті, өйткені иммунделген зертханалық жануарлардың сарысу үлгілілеріндегі антиденелер жұпталған ақуыздармен айтарлықтай жоғары сұйылтылымдарында әрекеттесе алды (3 кесте).

**Кесте 3.** Бруцеллалардың мультипротеинді антигендерінің иммуногенділігі

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



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

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

Аталмыш анти-мультипротеинді сарысулар жанама ИФТ-інде жекелеген рСМА-ның антигенділігін зерттеуде қолданылды (4 кесте).

**Кесте 4.** Анти-мультипротеинді сарысуларда бруцелланың жекелеген рекомбинантты ақуыздарының телімділігі

Тышқан анти-мультипротеиндік сарысуларының түрлері					
анти-рСМА25/19		анти-рСМА19/31		анти-рСМА25/31	
ж-ИФТ қолданылған антигендер					
рСМА 19	рСМА2 5	рСМА1 9	рСМА3 1	рСМА2 5	рСМА 31
Антиденелердің орташа титрі					
1:800 (+24,0 %; - 19,7%)	1:610 (+15,7 %; -13,5%)	1:170 (+24,0 %; -19,7%)	1:320 (+24,0 %; -19,7%)	1:460 (+24,0 %; -19,7%)	1:300 (+7,2% ; -6,7%)
ОПи/ОПк орташа көрсеткіштері					
2,35±0, 12	2,35±0, 12	2,51±0, 10	2,77±0, 23	2,65±0, 08	2,61±0, 09

Қолданылған антисарысулар мен антигендердің түрлеріне байланысты рСМА19, 25 және 31-ге қарсы антиденелер 1: 170 - 1: 800 аралықтағы титрлерде анықталды. Кесте деректеріне сүйенсек, жекеленген ақуыздардың арасында рСМА19 жоғарғы антигенділікті СМА25/19 сарысуындағы антиденелерге қатынасты көрсетіп отыр ( $P \leq 0,05$  -  $P \leq 0,01$ ).

## ТАЛҚЫЛАУ

Өткен ғасырда әзірленген АР, РБС және КБР бруцеллездің серологиялық диагностикасының негізгі әдістері ретінде бүгінгі күнге дейін танылып отыр. Қазіргі таңда ветеринария практикасына бруцеллездің диагностикасына арналған сезімталдығы жоғары әдістер қолданыла бастады. Мысал ретінде таңбаланған антиденелер немесе антигендерді қолдануға негізделген ИФТ және иммунды хроматография тәсілін (ИХТ) айтуға болады. Аталған сыналымдардың қолданысқа кеңірек енуіне негізгі кедергі - *Brucella* spp. арналған телімді антигеннің жоқтығы. Бруцелла жасушаларының полисахаридті антигендеріне

қарсы антиденелерді анықтауға негізделген дәстүрлі серологиялық реакциялар және қазіргі кезде малдәрігерлік препараттар нарығында қолжетімді шетелдік ИФТ-жиынтықтар серологиялық зерттеулер кезінде жалған оң нәтижелерге әкелуі әбден мүмкін. Бруцеллалардың полисахаридті емес компоненттерінің арасында ақуыздық антигендер ауру қоздырғышына телімдірек болып отыр. Алдыңғы зерттеулерімізде біз жекелеген СМА негізіндегі ИФТ-і бруцеллезге РБС бойынша оң нәтиже берген барлық серопозитивті жануарларды анықтай алмайтындығын дәлелдеген болатынбыз. Бұл факт бізге қоздырғыштың бірнеше рекомбинантты ақуыздарынан құрастырылған антиген ИФТ-інде ауру малдарды толық анықтауға мүмкіндік беруі мүмкін деген болжам жасауға негіз болды. Дегенмен, құрама антигенді жасау - диагностикалық қымбаттауына әкеледі, өйткені бұл жағдайда екі және одан көп ақуыздарды өндіретін штамм-продуценттерді өсіру және бірнеше ақуыздарды тазалау бойынша күрделі жұмыстарды жүргізуге тура келеді. Сонымен қатар, мұндай антигеннің құрамындағы жеке ақуыздарда әлсіз антигендік аймақтардың болуы мүмкін және олар ИФТ-інде қолданылатын қатты фазаға байланысу үшін өзара бәсекеге түсуі де мүмкін.

Бұл жұмыста біз мультипротеинді антигендердің үш түрін дайындадық (рСМА19/25, рСМА19/31 және рСМА25/31). Олардың әрқайсысы *Brucella*-ның екі СМА-ның иммунодоминантты фрагменттерінен құрастырылды және рЕТ28 плазмидасымен *E. coli* BL21 (DE3) жасушаларында жақсы экспрессияланды. Рекомбинантты ақуыздардың олардың нативті түрлерінен айырмашылықтарының болу мүмкіндігі белгілі жәйт. Одан қалды, экспрессия және/немесе тазалаудан кейін рекомбинантты ақуыздар кейбір қызметтерін жоғалтып та алады. Сонымен қатар, иммуноблот процедурасы да ақуыздың құрылымына әсер етпей қоймайды. Тіпті, *in vitro* немесе *in vivo* жағдайларында ақуыздардың иммунореактивтілігінің өзгеріске ұшырауын да назардан тыс қалдыруға болмайды [18]. *B. abortus* 544 вирулентті штамымен арнайы жұқтырылған сиырдың иммунды сарысуымен қойылған иммуноблот нәтижелері рекомбинантты мультипротеиндердің қоздырғыштың табиғи ақуыздарынан айырмашылығының жоқтығын көрсетті. Бұл нәтиже гибриді ақуыздардың *E. coli* жасушаларымен белсенді түрінде синтезделгендігінің дәлелі болып табылады. Жекеленген рСМА-ға қарсы антиденелер қолданылған барлық мультипротеиндермен өзара байланысқа түсе алды, ал бұл жәйт мультипротеинді антигендердің құрамындағы ақуыз фрагменттерінің антигенділігінің сақталу дәлелі болып табылады. Айта кететін мәселе, анти-мультипротеинді антиденелер, өз кезегінде, жекеленген ақуыздардың құрылымында өз эпитоптарын тани алды. Мультипротеиндер өздерін тышқан моделінде айтарлықтай иммуногенді препараттар ретінде көрсете алды. Иммуногендермен екі рет егілген зертханалық жануарлардан алынған қан сарысу үлгілерінде антиденелер айтарлықтай жоғары титрлерде анықталды (1: 1040 - 1: 3940). Қорыта айтқанда, қол жеткізген нәтижелер СМА-нан құрастырылған рекомбинантты мультипротеиндерді ИФТ-інде *Brucella*-ларға телімді антиденелерді анықтауда қолданыс таба алатын перспективті антиген ретінде көрсетіп отыр.

### Алғыстар

Бұл жұмыс 2018-2020 жылдар аралығында №BR05236307 ғылыми-техникалық бағдарлама аясында ҚР Білім және ғылым министрлігі тарапынан қаржыландырылды.

### БИБЛИОГРАФИЯЛЫҚ ТІЗІМ

1. Animal Disease Information. Brucellosis OIE 2006-2017. - [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/BCLSEN.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BCLSEN.pdf)).
2. McDermott J., Grace D., Zinsstag J. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries // Rev., Sci. Tech.- 2013. - Vol.32. -P. 249-261.
3. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. The new global map of human brucellosis // Lancet Infect.- 2006. - Vol. 6. -P.91-99.
4. Bonfini B., Chiarenza G., Paci V., Sacchini F., Salini R., Vesco G., Villari S., Zilli K. and Tittarelli M. Cross reactivity in serological tests for brucellosis: a comparison of immune response of *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* O:9 vs *Brucella* spp.//Vet. Ital. – 2018. - Vol.54, №2. - P.107-114.
5. Ешмухаметов А.Е., Бейсембаев К.К., Асауова Ж.С., Султанова А.О. Мониторинг и анализ эпизоотической ситуации по бруцеллезу крупного рогатого скота в Республике Казахстан за 2007-2015 годы // Вестник Костанайского государственного университета им. А.Байтурсунова. – 2016. - №2. - С.36-41.
6. Faria A.R., Dorneles E.M.S., Pires S.D.F., Andrade H.M.D. and Lage A.P. Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals potential of recombinant antigens for discriminating vaccinated from naturally infected cattle// Microb. Pathog.- 2020.- Vol. 147: Article number 104345.
7. Cassataro J., Pasquevich K., Bruno L., Wallach J.C., Carlos A.F. and Pablo C.B. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucella*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2004. –Vol. 11, №1. – P.111-114.
8. Gupta V.K., Verma D.K., Singh S.V. and Vihan V.S. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucellamelitensis* in goat and sheep brucellosis. *Small Rumin. Res.* – 2007.- Vol. 70, №2-3. – P.260-266.
9. Булашев А.К., Сураншиев Ж.А., Жумалин А.Х. и Турсунов К.А. Антигенность белков внешней мембраны бруцелл // Биотехнология. Теория и Практика. -2016. - №1.- С. 20-27.
10. Bulashev A., Akibekov O., Suranshiyev Zh.A., Ingirbay B. and Eskendirova S. Serodiagnostic potential of *Brucella* outer membrane and periplasmic proteins. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* – 2019.- Vol.43, №4. – P. 486-493.
11. Simborio H.L.T., Lee J.J., Reyes A.W.B., Hop H.T., Arayan L.T., Min, W., Lee, H.J., Yoo, H.S. and Kim, S. Evaluation of the combined use of the recombinant *Brucella abortus* Omp10, Omp19 and Omp28 proteins for the clinical diagnosis of bovine brucellosis // Microb.Pathog. -2015. – Vol. 83, №84. – P.41-46.
12. Ahmed I., Khairani-Bejo S., Hassan L., Bahaman A. and Omar A. Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay// *BMC Vet. Res.* - 2015. – Vol. 11. – P. 275.
13. Bulashev A., Akibekov O., Syzdykova A., Suranshiyev Zh. and Ingirbay B. Use of recombinant *Brucella* outer membrane proteins 19, 25, and 31 for serodiagnosis of bovine brucellosis// *Vet. World.* – 2020. – Vol. 13, №7. – P.1439-1447.
14. Tibor A., Saman, E., de Wergifosse, P., Cloeckaert, A., Limet, J.N. and Letesson, J.J., (1996) Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucellaabortus*. *Infect. Immun.*, 64 (1): 100-107.
15. Wergifosse Ph., Lintermans P., Limet J. and Cloeckaert A. Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*// *J. Bacteriol.*- 1995.-Vol.177, №7.-P.1911–1914. doi: [10.1128/jb.177.7.1911-1914.1995](https://doi.org/10.1128/jb.177.7.1911-1914.1995)

16. Vizcaino N., Kittelberger R., Cloeckaert A., Marin C.M., and Fernandez-Lago L., Minor nucleotide substitutions in the Omp31 gene of *Brucella* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species// *Infect. Immun.*- 2001. – Vol.69, № 11.- P.7020-7028. doi: [10.1128/IAI.69.11.7020-7028.2001](https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.7020-7028.2001)

17. Сайдулдин Т.С. Статистический анализ результатов серологических реакций. // *Ветеринария.*- 1981. – Т.7. – С.62-66.

18. Navarro-Soto M., Morales-Loredo A., Álvarez-Ojeda G., Ramírez-Pfeiffe, C., Tamez-Guerra P. and Gomez-Flores R. Recombinant proteins as antigens in serological diagnosis of brucellosis. In: Baddour, M.M., ed. Updates on Brucellosis.- 2015. -Intech Open, Rijeka, Croatia. - P.161-169.

## REFERENCES

1. Animal Disease Information. Brucellosis OIE 2006-2017. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/BCLSEN.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BCLSEN.pdf)).

2. McDermott J., Grace D., Zinsstag J. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Rev. Sci. Tech.*, 2013, vol.32, pp. 249-261.

3. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect*, 2006, vol. 6, pp.91-99.

4. Bonfini B., Chiarenza G., Paci V., Sacchini F., Salini R., Vesco G., Villari S., Zilli K. and Tittarelli M. Cross reactivity in serological tests for brucellosis: a comparison of immune response of *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* O:9 vs *Brucella* spp. *Vet. Ital.* 2018, vol.54, no.2, pp.107-114.

5. Eshmuhametov A.E., Bejssembaev K.K., Asauova ZH.S., Sultanova A.O. Monitoring i analiz epizooticheskoy situacii po brucellezu krupnogo rogatogo skota v Respublike Kazahstan za 2007-2015 gody. *Vestnik Kostanajnskogo gosudarstvennogo universiteta im. A.Bajtursunova*, 2016, vol. 2, pp.36-41.6.

6. Faria A.R., Dorneles E.M.S., Pires S.D.F., Andrade H.M.D. and Lage A.P. Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals potential of recombinant antigens for discriminating vaccinated from naturally infected cattle. *Microb. Pathog.*, 2020, vol.147, article number 104345.

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

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

9. Bulashev A.K., Suranshiev ZH.A., ZHumalin A.H. i Tursunov K.A. Antigennost' belkov vneshnej membrany brucell. *Biotekhnologiya. Teoriya i Praktika*, 2016, no.1, pp. 20-27.

10. Bulashev A., Akibekov O., Suranshiyev Zh.A., Ingirbay B. and Eskendirova S.) Serodiagnostic potential of *Brucella* outer membrane and periplasmic proteins. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 2019, vol. 43, no.4, pp.486-493.

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

12. Ahmed I., Khairani-Bejo S., Hassan L., Bahaman A. and Omar A. () Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from



*Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *BMC Vet. Res.*, 2015, vol.11, pp. 275.

13. Bulashev A., Akibekov O., Syzdykova A., Suranshiyev Zh. and Ingirbay B. Use of recombinant *Brucella* outer membrane proteins 19, 25, and 31 for serodiagnosis of bovine brucellosis. *Vet. World*, 2020, vol.13, no.7, pp. 1439-1447.

14. Tibor A., Saman, E., de Wergifosse P., Cloeckaert A., Limet J.N. and Letesson J.J., Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, 1996, vol.64, no. 1, pp.100-107.

15. Wergifosse Ph., Lintermans P., Limet J. and Cloeckaert A. Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.*, 1995, vol.177, no. 7, pp. 1911–1914. doi: [10.1128/jb.177.7.1911-1914.1995](https://doi.org/10.1128/jb.177.7.1911-1914.1995)

16. Vizcaino N., Kittelberger R., Cloeckaert A., Marin C.M., and Fernandez-Lago L., Minor nucleotide substitutions in the Omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infect. Immun.*, 2001., vol.69, no.11, pp. 7020-7028. doi: [10.1128/IAI.69.11.7020-7028.2001](https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.7020-7028.2001)

17. Sajduldin T.S. Statisticheskij analiz rezul'tatov serologicheskikh reakcij. *Veterinariya*, 1981, vol. 7, pp. 62-66.

18. Navarro-Soto M., Morales-Loredo A., Álvarez-Ojeda G., Ramírez-Pfeiffer C., Tamez-Guerra, P. and Gomez-Flores, R. Recombinant proteins as antigens in serological diagnosis of brucellosis. In: Baddour, M.M., ed. *Updates on Brucellosis*. 2015Intech Open, Rijeka, Croatia. - p.161-169.

## ПОЛУЧЕНИЕ МУЛЬТИБЕЛКОВЫХ АНТИГЕНОВ БРУЦЕЛЛ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ

Іңірбай Б.К., Сыздыкова А.С., Курмашева А.К., Булашев А.К.

Казахский исследовательский агротехнический университет им. Сейфуллина  
пр.Женис, 62, Нур-Султан, 010011, Казахстан

### АБСТРАКТ

Для прижизненной диагностики бруцеллеза животных, в основном, используются: Роз-Бенгал проба, реакция связывания комплемента и реакция агглютинации. Эти реакции характеризуются низкой чувствительностью и специфичностью, что является одной из основных причин низкой эффективности борьбы с данной инфекцией. Использование современных высокочувствительных серологических тестов требует доступности антигенов, специфичных для бактерий рода *Brucella*. Целью настоящей работы явилось получение мультипротеинов патогена методом рекомбинантной ДНК технологии и изучение их антигенных свойств. В ходе реализации работы были получены три вида мультипротеинов, сконструированные из диагностически важных пептидов, входящих в состав белков внешней мембраны *B. abortus* и *B. melitensis*. Все целевые продукты синтезировались штаммом-продуцентом в виде, аутентичном природным белкам, и показали иммуногенность для организма мышей. Антитела, выработанные против мультипротеинов, показали специфичность и по отношению к одиночным белкам клеточной стенки патогена. Полученные





данные указывают на необходимость продолжения исследований по определению возможности использования мультипротеинов в качестве антигена в иммуноферментном анализе для обнаружения *Brucella*-специфичных антител.

Ключевые слова: *Brucella* spp., белок внешней мембраны, антиген, серологическая диагностика

## OBTAINING MULTIPROTEIN ANTIGENS OF BRUCELLA AND STUDY OF THEIR IMMUNOREACTIVITY

Ingirbai BK., Syzdykova A., Kurmasheva A.K., Bulashev A.K.

S. Seifullin Kazakh Agro Technical University  
Zhenis avenue, 62, Nur-Sultan, 010011, Kazakhstan

### ABSTRACT

Rose-Bengal test, complement fixation test and the agglutination test are mainly used for the diagnosis of animal brucellosis. These tests are characterized by low sensitivity and specificity, which is one of the main reasons for the low effectiveness of measures aimed at eradicating brucellosis. The use of modern highly sensitive serological tests requires the availability of antigens specific to *Brucella* spp. The aim of the study was to obtain multiproteins of the pathogen by recombinant DNA technology and to study their antigenic properties. In the course of the study, three types of multiproteins were obtained, constructed from diagnostically important peptides that form *B.abortus* and *B.melitensis* outer membrane proteins. All target products were synthesized by the producer strain in a form that is authentic to natural proteins, and showed immunogenicity in mouse model. Antibodies produced against the multiproteins were specific for the single proteins of the pathogen's cell wall. The data obtained indicate the need to continue studies to determine the possibility of using multiproteins as an antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-*Brucella* specific antibodies.

Keywords: *Brucella* spp., outer membrane protein, antigen, serological diagnostics