

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЛКОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ BRUCELLA В СЕРОДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА

А.К. Булашев, О.С. Акибеков, А. Сыздыкова, Ж.А. Сураншиев, Б. Инербай

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Нур-Султан, Республика Казахстан

### ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез остается одним из самых распространенных зоонозов в мире. Одной из основных причин низкой эффективности мер против бруцеллеза является недостаточная специфичность традиционных серологических тестов, таких как роз-бенгал проба (РБП), реакция агглютинации (РА) и реакция связывания комплемента (РСК), основанных на использовании липополисахаридов клеточной стенки гладких штаммов (S-ЛПС) бактерий рода *Brucella*. Последние могут проявлять перекрестные реакции с близкородственными бактериями, такими как *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* и др. Кроме того, S-ЛПС создают определенную проблему в дифференциации больных от вакцинированных против бруцеллеза животных в случае использования аттенуированных гладких штаммов бруцелл [1].

Достижения генетической инженерии открыли новые перспективы для изучения более специфического компонента клеточной стенки, а именно белков, с целью использования их в качестве диагностических и / или вакцинных препаратов [2]. Среди непалисахаридных компонентов *Brucella* spp. белки наружной мембраны (БНМ) представляют наибольший интерес для исследователей, занимающихся совершенствованием диагностики бруцеллеза [3]. Тем не менее, потенциал рекомбинантных БНМ в серологической диагностике бруцеллеза все еще остается недостаточно изученным, а имеющиеся результаты иногда противоречат друг другу. Так, например, на мышинной модели было установлено, что иммуноферментный анализ (ИФА) на основе комбинированных БНМ может дифференцировать постинфекционные анти – *B. melitensis* антитела от вакцинных и / или перекрестно реагирующих антител [4]. Однако наши предыдущие исследования показали, что антитела к рекомбинантным БНМ с молекулярной массой 25кДа (БНМ25) и 31кДа (БНМ31) могут быть обнаружены не только у инфицированных коров, но и у некоторых здоровых животных, вакцинированных *B. abortus* 19 [5]. Более того, антигенность другого белка – БНМ19 по отношению к антителам инфекционного и вакцинного происхождения до сих пор остается неизученной.

Цель работы – сравнительное изучение серологического потенциала БНМ19, БНМ25 и БНМ31 в непрямом ИФА (н-ИФА) при определении *Brucella* – специфических антител.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Приготовление суспензии клеток *B. abortus* 19.** Клетки бруцелл культивировались на эритроцит агаре (Микроген, Махачкала, Россия). Выращенная культура проверялась на чистоту и типичность роста, затем смывалась 0,5 % фенолизированным раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и выдерживалась в инкубаторе при 37 °С в течение 48 часов для инактивации бактериальных клеток. Затем клеточная суспензия трижды промывалась центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 минут.

**Рекомбинантные белки.** В работе были использованы рекомбинантные белки бруцелл, полученные в наших предыдущих исследованиях: БНМ19 [6], БНМ25 и БНМ31 [7]. Для очистки рекомбинантных белков были использованы колонки His Trap на основе металл-аффинной хроматографии в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare Life Sciences, Кардифф, Великобритания). Присутствие целевых белков было подтверждено вестерн-блоттингом с использованием моноклональных антител против His-Tag, конъюгированных с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

**Получение антител против цельных клеток (ЦК) *B. abortus* 19.** Иммунизация кролика суспензией убитых фенолом ЦК проводилась подкожно по описанной ранее методике [4]. Образцы крови брали из краевой вены уха под седативным эффектом перед иммунизацией (0 день) в качестве отрицательного контроля, а затем на 14, 21, 35 и 45 дни иммунизации для определения уровня антителообразования. Образцы сыворотки хранили при -20 °С до использования.

*Сыворотки крови.* В работе было использовано 327 сывороток крови крупного рогатого скота (КРС). Из них 12 сывороток принадлежали КРС, экспериментально зараженному вирулентным штаммом *B. abortus* 544. Эти сыворотки были любезно предоставлены профессором К. Табыновым, заведующим лабораторией по профилактике инфекционных заболеваний Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Республика Казахстан (РК). 152 образца сывороток невакцинированных серопозитивных коров из свежих эпизоотических очагов бруцеллеза были получены из коллекции Национального референтного центра ветеринарии МСХ РК. 151 образец крови был взят у ревакцинированных коров крестьянского хозяйства «Мереке» (Бухаржырауский район, Карагандинская область, РК), благополучного по бруцеллезу. Коровы были привиты в 2015 году в возрасте 5–6 месяцев подкожно полной дозой ( $8 \times 10^{10}$  клеток) *B. abortus* 19 (Щелковский биокомбинат, Московская область, Россия), и в течение последующих трех лет ревакцинировались той же вакциной конъюнктивально в дозе  $8 \times 10^9$  клеток. 12 сывороток крови, полученные от не вакцинированных и серонегативных по комплексу традиционных реакций (РБП, РА и РСК) телок, были использованы в качестве негативного контроля.

*Определение антигенности рекомбинантных белков в н-ИФА.* Вкратце, лунки полистирольного планшета покрывали БНМ19, БНМ25 и / или БНМ31 в концентрации 1,0 мкг/мл в бикарбонатном буфере, рН 9,6. В 8 лунках, покрытых определенным белком, готовили разведения кроличьей антисыворотки против ЦК *B. abortus* 19 и / или сыворотки КРС в ФСБ с твином 20, начиная с разведения 1:100, и планшет выдерживали при 37 °С в течение 1 часа. Количество связанных антител определяли антивидовыми антителами против кроличьего (Jackson ImmunoResearch, West Grove, США) и / или бычьего иммуноглобулинов, меченных пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). В качестве титра кроличьих антител брали то разведение сыворотки, оптическая плотность (ОП) которой была в два или более раз выше, чем ОП неиммунной (отрицательной) сыворотки в разведении 1: 100. Предельное значение (*cutoff*) для КРС рассчитывали, используя среднюю ОП сывороток контрольных телок, и результаты считали положительными, если ОП лунки с исследуемой сывороткой (ОПис) было выше, по меньшей мере, в два раза средней ОП контрольных сывороток (ОПкс) в разведении 1: 100.

*Постановка РБП.* РБП (Антиген, Алматы, Казахстан) проводился согласно инструкции производителя.

*Гель-электрофорез и вестерн блот анализ.* БНМ *Brucella* индивидуально фракционировали с помощью электрофореза в 12 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, затем гель переносили на 0,45 мкм нитроцеллюлозную мембрану (Watman Nytran Supercharge Aldrich, Сент-Луис, США) и иммуноблот проводили классическим методом. После промывки и блокировки мембрану инкубировали в сыворотке крови коровы (№ 6), экспериментально инфицированной *B. abortus* 544, и / или в кроличьей антисыворотке против ЦК *B. abortus* 19. Специфические белковые полосы проявляли 4-хлор-1-нафтолом (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США).

*Статистическая обработка результатов.* Односторонний ANOVA был использован для статистического сравнения средних значений ОПис/ОПкс. Статистический анализ титров антител проводили по методике, описанной Т. Сайдулдином [8]. Результаты считались значимыми при уровне вероятности менее 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

БНМ19 *Brucella* заметно уступал другим использованным белкам по антигенности (реактивности) в кроличьей антисыворотке. Средние титры антисывороток, взятых на 14, 21, 35 и 45 дни против БНМ19, были значительно ниже (1: 980), чем титры БНМ25 (1: 1970) и БНМ31 (1: 1490) ( $P < 0,05$ ). Эти данные указывают, во-первых, на то, что изучаемые рекомбинантные белки распознаются кроличьей анти-ЦК *B. abortus* 19 сывороткой, а во-вторых, доказывают их экспрессию *E. coli* BL21 в нативном состоянии.

На рисунке приведены результаты сравнительного исследования реактивности БНМ19, БНМ25 и БНМ31 в сыворотке КРС, экспериментально зараженного *B. abortus* 544.

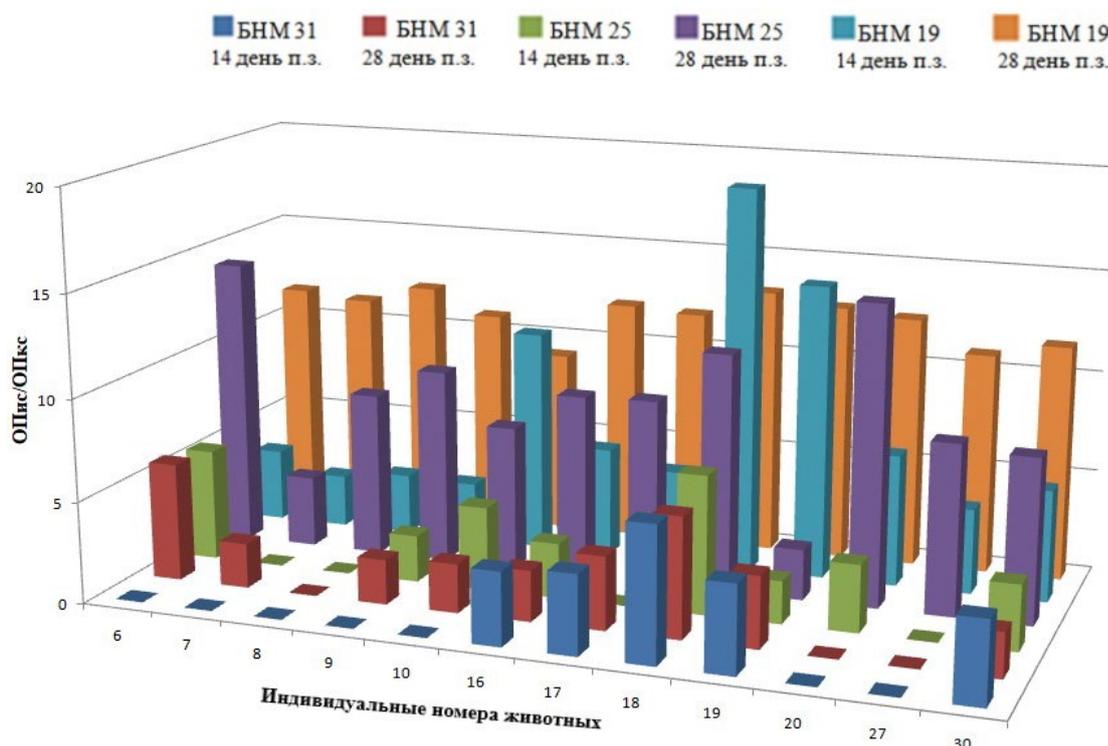


Рисунок – Антигенность БНМ *Brucella* в сыворотке крови экспериментально зараженных животных

Из рисунка видно, что н-ИФА/БНМ19 был более чувствительным, чем иммуноанализ, основанный на двух других рекомбинантных белках. Например, на 14 день после заражения (п.з.) у всех экспериментально инфицированных животных были обнаружены анти-БНМ19 антитела, в то время как н-ИФА/БНМ31 и н-ИФА/БНМ25 обнаруживали присутствие *Brucella*-специфических антител только у 42 % и 67 % животных, соответственно. Антитела против БНМ31 не были обнаружены у 3 животных (№№ 8, 20 и 27) как на 14, так и на 28 сутки п.з. Более того, судя по значениям ОПис/ОПкс, уровень образования антител против БНМ31 в течение этого периода не претерпел значительных изменений, тогда как гуморальный ответ на БНМ19 и БНМ25 стал более выраженным:  $6,9 \pm 3,0 - 11,6 \pm 1,1$  ( $P < 0,05$ ) и  $2,9 \pm 1,8 - 8,8 \pm 3,6$ ;  $P < 0,01$ ), соответственно.

Титры антител у зараженных животных к использованным белкам на 14 сутки п.з. находились на одном и том же уровне: БНМ19 – 1:650 (+36,6 %; -27,3 %), БНМ25 – 1:400 (+36,6 %; -27,3 %) и БНМ31 – 1:420 (+18,9 %; -15,9 %). Однако на 28 день п.з. средний титр антител к БНМ19 был значительно выше (1:6400), чем у БНМ25 и БНМ31 (1:2 600 и 1:2 200, соответственно;  $P \leq 0,05$ ). Интересно отметить, что БНМ19 был менее реактивен в кроличьей анти-ЦК *B. abortus* 19 сыворотке по сравнению с БНМ25 и БНМ31, однако он показал относительно высокую антигенность в ИФА при серологическом тестировании КРС, инфицированного *B. abortus* 544. Представление БНМ19 иммунной системе организма живыми и инактивированными бруцеллами, видимо, несколько отличается по сравнению с экспозицией двух других белков, что привело к получению неоднозначных результатов при использовании сывороток кроликов, иммунизированных убитыми клетками, и КРС, экспериментально зараженного бруцеллезом. Ранее нами было описано ярко выраженное антигенное свойство белка *B. abortus* и *B. melitensis* с молекулярной массой 19кДа в вестерн-блот при использовании сыворотки крови коровы, спонтанно зараженной бруцеллезом [9]. Приведенные выше данные свидетельствуют о более высокой реактивности БНМ19 по сравнению с БНМ25 и БНМ31. Эти результаты согласуются с выводами J.J. Letesson et al. (1997) о более высокой антигенности минорных внешне-мембранных белков, включая БНМ19, по сравнению с мажорными белками [3]. По мнению авторов, данный феномен связан с сохранением антигенности БНМ19, поскольку он представляет собой не интегральный мембранный белок, а липопротеин и, следовательно, влияние мембранных компонентов на его антигенность является менее вероятным.

При изучении антигенности белков методом иммуноблота сыворотка коровы № 6, взятая на 28 сутки п.з. *B. abortus* 544, выявила только полосу БНМ19, тогда как антитела кролика, полученные против инактивированных ЦК *B. abortus* 19, связывались с БНМ25, БНМ31 и БНМ19, расположенными на уровнях 42 кДа, 48 кДа и 19 кДа, соответственно. Первые две полосы соответствовали молекулярным массам слитых белков БНМ25 и БНМ31, экспрессируемых штаммом-продуцентом *E. coli*. Хорошо известно, что многие молекулы могут стать более иммуногенными при денатурации. Обработка ЦК *Brucella* фенолом может изменить структуру его БНМ и обнажить новые эпитопы. Инъекция денатурированных антигенов, по всей вероятности, индуцирует антителообразование против детерминант, которые не доступны для иммунной системы на нативном антигене [10]. В организме зараженного животного серологически важные эпитопы БНМ25 и / или БНМ31, видимо, менее доступны для иммунной системы, чем детерминанты БНМ19. Кроме того, следует учесть и денатурирующие условия, имеющие место во время иммуноблота и приводящие к изменениям третичной структуры рекомбинантных белков. Наконец, антигенные и / или иммуногенные свойства белков патогена могут быть различными в условиях культивирования бруцелл *in vitro* и *in vivo* [2].

Антигенность БНМ бруцелл в сыворотках крови коров из благополучных и неблагополучных по бруцеллезу ферм показана в таблице.

Таблица – Реактивность белков бруцелл в н-ИФА при серологических исследованиях коров из ферм с различной эпизоотической ситуацией

Количество исследованных коров (гол.)	Эпизоотический статус ферм по бруцеллезу	Серологические тесты			
		РБП	н-ИФА на основе рекомбинантных белков:		
			БНМ19	БНМ25	БНМ31
количество животных с положительными результатами, гол. (%)					
151	благополучный	96 (63,5)	92 (60,9)	64 (42,4)	93 (61,6)
152	неблагополучный	152 (100)	152 (100)	152 (100)	146 (96,7)

В образцах сыворотки крови коров, ревакцинированных *B. abortus* 19, антитела обнаруживались и через 10 месяцев после последней иммунизации у более чем половины скота (61–64 %) в РБП, н-ИФА/БНМ31 и н-ИФА/БНМ19 со средними титрами 1:210 (+3,5 %; -3,3 %) и 1:280 (+4,2 %; -4,0 %), соответственно. БНМ25 оказался менее антигенным, поскольку антитела к нему были обнаружены у 42 % КРС со средним титром 1:250 (+5,0 %; -4,8 %). Следует подчеркнуть, что сыворотка почти одной трети коров (28 %) не содержала антител, которые могли бы взаимодействовать, по крайней мере, с 1 из 3 рекомбинантных белков. Антитела к 1 и / или 2 из 3 использованных белков были обнаружены у 13 % и / или 28 % коров, соответственно. Между результатами н-ИФА/БНМ19-н-ИФА/БНМ31 была установлена прямая сильная корреляция с коэффициентом 0,70. Умеренная корреляция наблюдалась между н-ИФА/БНМ19-н-ИФА/БНМ25 ( $r = 0,38$ ) и н-ИФА/БНМ31-н-ИФА/БНМ25 ( $r = 0,35$ ).

У серопозитивных коров из неблагополучных ферм агглютинирующие антитела в РБП обнаруживались у всего исследованного поголовья. Результаты этого теста полностью подтверждались результатами н-ИФА/БНМ19 и н-ИФА/БНМ25 со средними титрами 1:280 и 1:370 (+ 2,1 %; -2,1 %), соответственно. Только 4 % РБП-позитивных животных не имели антитела, связывающиеся с БНМ31. Средний титр антител к этому белку составил 1:350 (+2,8 %; -2,7)%. Титры антител коров из ферм с различным эпизоотическим статусом не отличались друг от друга по показаниям н-ИФА/БНМ19, однако анти-БНМ25 и анти-БНМ19 антитела детектировались в более высоких разведениях сывороток крови коров из эпизоотического очага ( $P < 0,05$ ). БНМ19, как и БНМ25, показал высокую реактивность по отношению к антителам серопозитивных коров из эпизоотических очагов бруцеллеза, обеспечивая 100 % чувствительность к ИФА. Нельзя не отметить, что антитела, взаимодействующие с БНМ, также были обнаружены у более чем половины животных благополучного стада даже через 10 месяцев (время наблюдения) после ревакцинации *B. abortus* 19.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

– Антитела к БНМ бруцелл вырабатываются КРС как зараженным бруцеллезом, так и привитым аттенуированной вакциной из штамма *B. abortus* 19;

– Раздельное использование БНМ в качестве антигена в н-ИФА снижает чувствительность анализа, что может быть связано с неузнаваемостью одного белка антителами, имеющими специфичность к другим белкам;

– Антиген, состоящий из комбинации БНМ19, БНМ25 и БНМ31, можно рекомендовать для использования в н-ИФА с целью достоверного выявления инфицированного КРС перед первой вакцинацией.

**Работа проводилась в рамках научно-технической программы № BR05236307 «Создание новых продуктов и инновационных биотехнологий для сельского хозяйства и ветеринарии» на 2018–2020 годы.**

### ЛИТЕРАТУРА

1. 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. // *Veterinaria Italiana*. – 2018. – Vol.54(2). – P. 107–114.
2. Navarro-Soto M., Morales-Loredo A., Álvarez-Ojeda G., Ramírez-Pfeiffer C., Tamez-Guerra P. and Gomez-Flores R. Recombinant proteins as antigens in serological diagnosis of brucellosis // In: Baddour M.M. (editor), *Updates on Brucellosis*. Rijeka, Croatia: IntechOpen. – 2015. – P. 161–169.
3. Letesson J., Tibor A., van Eynde G., Wansard V., Weynants V. et al. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme linked immunosorbent assay // *Clinical and Diagnostic Laboratory*. – 1997. – Vol.4(5). – P.556–564.
4. Ahmed I., Khairani-Bejo S., Hassan L., Bahaman A. Serological diagnostic potential of outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay // *BMC Veterinary Research*. – 2015. – 11: 275.
5. Bulashev A., Akibekov O., Suranshiyev Zh., Ingirbay B. and Eskendirova S. Serodiagnostic potential of *Brucella* outer membrane and periplasmic proteins // *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. – 2019. – Vol. 43. – P.486–493.
6. Булашев А.К., Турсунов К.Т., Каирова Ж.К., Сыздыкова А. Получение штамма продуцента рекомбинантного БВМ19 *Brucella abortus* и изучение его антигенности // *Вестник КазАТУ им. С. Сейфуллина*. – 2018. – № 3(98). – С.117–128.
7. Bulashev A., Jakubowski T., Tursunov K., Kiyani V., Zhumalin A. Immunogenicity and antigenicity of *Brucella* outer membrane proteins // *Veterinarija ir Zootechnika*. – 2018. – Vol.76(98). – P.17–24.
8. Сайдуллин Т.С. Статистический анализ результатов серологических реакций // *Ж. Ветеринария*. – 1981. – № 7. – С. 62–66.
9. Булашев А.К., Сураншиев Ж.А., Жумалин А.Х., Турсунов К.А. Антигенность белков внешней мембраны бруцелл // *Ж. Биотехнология. Теория и практика*. – 2016. – № 1. – С. 20–27.
10. Greenfield E.A., DeCaprio J. and Brahmandam M. Making weak antigens strong: Modifying protein antigens by denaturation, *Cold Spring Harbor Protocols*. doi: 10.1101/pdb.prot099960, 2018.