

Наименование проекта: ИРН АР19677302 «Разработка РНГА-набора на основе рекомбинантных белков для диагностики бруцеллёза».

Актуальность: Эпизоотическая и эпидемическая ситуация по бруцеллёзу в Республике Казахстан остаётся весьма сложной. Более 60% сельских округов поражены бруцеллёзом животных, что не позволяет снизить заболеваемость и среди людей этой болезнью. Ранняя диагностика бруцеллёза животных является ключевым звеном в общей системе ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на искоренение этой инфекции.

В традиционных серологических реакциях, в том числе в коммерческих диагностических наборах, основанных на иммуноферментном анализе (ИФА), выявляются антитела, имеющие специфичность к гладким липополисахаридам (S-ЛПС) клеточной стенки бруцелл. Последние могут давать перекрёстные реакции с близкородственными бактериями из-за сходства антигенных эпитопов, что приводит к получению ложноположительных результатов. Для Казахстана, который занимает 9-ое место по своей территории и имеет недостаточный уровень оснащённости диагностических лабораторий, нужен диагностикум, не уступающий ИФА/S-LPS по чувствительности, но превосходящий его по специфичности и пригодный для массовых исследований животных на бруцеллёз. Такой диагностический тест может быть разработан на основе реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) при наличии антигена, специфичного для бруцелл.

Цель: Разработка РНГА-набора для серологической диагностики бруцеллёза, основанный на использовании эритроцитов, сенсibilизированных комбинированными рекомбинантными белками *Brucella* spp, экспрессируемых прокариотными штаммами-продуцентами.

Ожидаемые и достигнутые результаты

По завершении проекта будут:

- разработана научно-техническая документация: Стандарт организации, Инструкция по изготовлению и контролю «РНГА-набора...» и Наставление по применению «РНГА-набора...»;
- изготовлена опытная партия «РНГА-набора на основе рекомбинантных белков для диагностики бруцеллёза»;
- опубликованы 2 (две) статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Science Citation Index Expanded базы Web of Science и (или) имеющих процентиль по CiteScore в базе Scopus не менее 35 (тридцати пяти) и заявка на патент Derwent Innovations Index (Web of Science, Clarivate Analytics), а также статья в рецензируемом отечественном издании, рекомендованном КОКСНВО;
- доложены результаты на 3 (трех) научных форумах, в том числе и на международной конференции за рубежом с публикацией тезисов или статей в сборниках;
- проведены семинары для работников ветеринарных и медицинских диагностических лабораторий, а также практических врачей по применению «РНГА-набора...»;
- создана веб-страница на сайте Заявителя, на которой будет указана информация об итогах реализации проекта с целью поиска партнеров заинтересованных в коммерциализации научной продукции;
- защищена диссертация на соискание академической степени магистра наук по образовательной программе «Ветеринарная биотехнология»; выполнена диссертационная работа докторанта PhD по образовательной программе «Ветеринарная медицина», а также защищены 6 (шесть) дипломных работ студентами-бакалаврами.

В ходе реализации проекта в 2023 г:

- наработана бактериальная масса штаммов-продуцентов рекомбинантных внешне-мембранных (Omp19, Omp25, Omp31), периплазматических (BP26, SOD) и химерных белков бруцелл (Omp19+25, Omp19+31, Omp25+31);
- приготовлены очищенные препараты указанных рекомбинантных белков;
- получены кроличьи антисыворотки против цельных клеток *Brucella abortus* 19 и *B. melitensis* Rev1;
- получены мышьиные антисыворотки против цельных клеток родственных бактерий, таких как *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter fetus*, *Salmonella enteritidis* и *Pasteurella multocida*;
- изучены антигенность и специфичность внешне-мембранных и периплазматических рекомбинантных белков бруцелл в непрямом ИФА, иммуноблоттинге и РИД;
- отработаны оптимальные условия сенсibilизации эритроцитов рекомбинантными белками и приготовлен эритроцитарный антиген и изучена его специфичность в гомологичных и гетерологичных сыворотках в РНГА.

Члены исследовательской группы:

Руководитель проекта – Булашев Айтбай Кабыкешович, д.в.н., профессор кафедры Микробиологии и биотехнологии КазАТИУ, Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7801312328>; <https://www.webofscience.com/wos/author/record/GEF-9526-2022>; Researcher ID: O-7397-2017, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8427-509X>;

Исследовательская группа:

- Ескендинова Сауле Зиядиновна, к.в.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биотехнологии Национального центра по биотехнологии (НЦБ), по проекту: ведущий научный сотрудник: Scopus Author ID: 55438123400; ORCID 0000-0002-9570-7433; Research ID O-2344-2017;

- Акибеков Оркен Султанхамитович, к.в.н., ассоциированный профессор кафедры Микробиологии и биотехнологии КазАТИУ, по проекту: старший научный сотрудник, Scopus Author ID:56606295400, Researcher ID: O-7690-2017, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8647-0083>;

- Сыздыкова Альфия Сафиоллаевна, магистр наук, научный сотрудник НИПСХБ КазАТИУ, по проекту: научный сотрудник, Scopus Author ID:57193998019; Researcher ID: ААЕ-7700-2022, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5405-2469>;

- Іңірбай Бакыткали, PhD, НЦБ, научный сотрудник лаборатория генетической инженерии, по проекту: научный сотрудник; Scopus Author ID:57193571536, ORCID: 0000-0002-6915-8207;

- Жумалин Айбек Хасиетович, магистр сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник НИПСХБ КазАТИУ, по проекту: научный сотрудник, Scopus author ID: 57192061558, Researcher ID: ААЕ-7767-2022, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8661-7348>;

- Жагипар Фариза Сабиткызы, менеджер по приему проб и обработки информации Казахско-китайской лаборатории по биобезопасности КазАТИУ, по проекту: научный сотрудник, Researcher ID: ААЕ-7613-2022, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5296-1127>;

- Вакансия: младший научный сотрудник;

- Вакансия: лаборант.

Список публикаций и патентов опубликованные в рамках данного проекта:
(со ссылками на них)

Публикации за последние 5 лет:

1. Bulashev A.K., Jakubowski T., Mukantayev K.N., Tursunov K., Kiyan V., Zhumalin A. Using combined recombinant protein in the diagnosis of bovine brucellosis // *Medycyna Weterynaryjna.*- 2018.- Vol. 74 (3). – P.193-198; Q4/процентиль 28; цитирование 0/0; DOI: [dx.doi.org/10.21521/mw.6079](https://doi.org/10.21521/mw.6079);

2. Bulashev A.K., Jakubowski T., Tursunov K., Kiyan V., Zhumalin A. Immunogenicity and antigenicity of Brucella recombinant outer membrane proteins// *J. Veterinarija ir Zootechnika (Vet Med Zoot).*- Vol. 76 (98).- 2018.-P.17-24; Q4/процентиль 16, цитирование 1/2; <https://vetzoo.lsmuni.lt/2018-76-en/>;

3. Kiyan V.S., Bulashev A.K., Katokhin A.V. Opisthorchis felinus and Metorchis bilis Metacercariae in Cyprinid Fish Leuciscus idus in Nura-Sarysu River, Kazakhstan // *Korean Journal of Parasitology.* - 2018. - Vol.56, No.3. - P.267-274; Q2/процентиль 38; цитирование 2/1.; <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.3.267>.

4. Bulashev A.K., Akibekov O., Syzdykova A., Suranshiyev Zh., Ingirbay B. Use of recombinant Brucella outer membrane proteins 19, 25, and 31 for serodiagnosis of bovine brucellosis // *Veterinary World.* - 2020.-Vol. 13(7). - P.1439-1447; Q1, процентиль 79; цитирование 1/1 ; doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2020.1439-1447.

5. Kiyan V., Bulashev A., Zhumalin A., Smagulova A., Lider L. Immunogenicity and antigenicity of Opisthorchis felinus proteins // *Adv. Anim. Vet. Sci.*-2020.- Vol.8(9)/-P. 933-939; Q3/ процентиль 39; цитирование 0/0; <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.9.933.939>.

6. Ryskeldinova S., Zinina N., Kydyrbayev Z., Yespembetov B., Kozhamkulov Y., Inkarbekov D., Assanzhanova N., Mailybayeva A., Buggybayeva D., Sarmyкова M., Khairullin B., Tabynov K., Bulashev A., Aitzhanov B., Abeuov Kh., Sansyzbay A., Yespolov T., Renukaradhya G., Olsen S., Oñate A. and Tabynov K. Registered Influenza Viral Vector Based Brucella abortus Vaccine for Cattle in Kazakhstan: Age-Wise Safety and Efficacy Studies // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*// published: 01 July 2021, Volume 11, Article 669196; Q1/процентиль 72; цитирование 0/0.; doi: 10.3389/fcimb.2021.669196.

7. Булашев А., Сураншиев Ж., Серикова Ш. Бруцеллез балауындағы биотехнологиялық әдістер: ғылыми монография. Нұр-Сұлтан: ҚР Президенті Іс Басқармасының «ҚР Президентінің Әкімшілігі мен Үкіметінің әкімшілік ғимараты дирекциясы» ШЖҚ РМК Баспа-полиграфиялық орталығы. – 2021.- 295 б.

8. Sotnikov D., Barshevskaya L., Zherdev A., Eskendirova S., Mukanov K, Ramankulov E., Dzantiev B. Immunochromatographic system for serodiagnostics of cattle brucellosis using gold nanoparticles and signal amplification with quantum dots // *Applied sciences.*- 2020.-V. 10.-P.738. IF 2,6 / Q3; doi:10.3390/app10030738.

9. Іңірбай Б.К., Сыздыкова А.С., Курмашева А.К., Булашев А.Қ. Бруцеллалардың мультипротеиндерін дайындау және олардың иммунореактивтілігін зерттеу // *Eurasian journal of Applied Biotechnology*, doi.org/10.11134/btp.1.2021.6;

10. Bulashev A.K., Ingirbay B.K., Mukantayev K.N., Syzdykova A.S. Evaluation of chimeric proteins for serological diagnosis of brucellosis in cattle // *Veterinary World.*-2021.- Vol.14(8). - P.2187-2196; Q1 процентиль 79; цитирование 0/0; doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.2187-2196;

11. Булашев А.К., Акибеков О.С., Сыздыкова А.С., Сураншиев Ж.А. и Ескендинова С.З. Серологический потенциал рекомбинантных белков Brucella spp. в диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота // *Вестник Новосибирского государственного аграрного университета.*-2020.-Т.1(54).-С.56-64; <https://doi.org/10.31677/2072-6724-2020-54-1-56-64>;

12. Булашев А.К., Сыздыкова А.С., Сураншиев Ж.А., Турсунов К.А., Ескендинова С.З. Объективная оценка потенциала рекомбинантных белков в диагностике бруцеллеза // *Ветеринария сельскохозяйственных животных (РИНЦ)* .-2020.-№1.- С.63-72; <https://elibrary.ru/item.asp?id=42631174>;

13. Barshevskaya L., Sotnikov D., Zherdev A., Khassenov B., Baltin K., Eskendirova S., Mukanov K., and Dzantiev B. Triple immunochromatographic system for simultaneous serodiagnosis of bovine brucellosis, tuberculosis and leukemia // Biosensors.- 2019.-V. 9(4).-P.115; doi:10.3390/bios9040115. IF 5,5 / Q1;

14. Bulashev A.K., 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.-V. 43.-P. 486-493; Q3/процентиль 51; цитирование 1/2; doi:10.3906/vet-1902-75;

15. Sotnikov D., Berlina A., Zherdev A., Eskendirova S., Mukanov K, Ramankulov E., Dzantiev B. Immunochromatographic serodiagnosis of brucellosis in cattle using gold nanoparticles and quantum dots.// International Journal of Veterinary Science.- 2019.-V. 8(1).-P.28-34. IF 0,9 / Q4; [https:// www.researchgate.net/publication/332153577](https://www.researchgate.net/publication/332153577)

16. Mukantayev K., Tursunov K., Ingirbay B., Adish Z., Azhibayeva M. and Kairova Z., Ramankulov E., Mukanov K., Shustov A. Immunochromatographic assay for the foot-and-mouth disease utilizing recombinant nonstructural proteins 2C, 3A, 3B and 3D // Bulgarian Journal of Agricultural Science.-2018.-Vol.24(3).-P.489-49; Q3; <https://www.agrojournal.org/24/03-21.html>;

17. Bulashev A.K., Suranshiyev Zh.A., Akibekov O.S., Akanova Zh.Zh. and Abulgazimova G. Serological diagnosis of cystic echinococcosis in cattle // Folia Parasitologica 2017, 64: 005 Q3/процентиль 46; цитирование 7/0; doi: 10.14411/fp.2017.005;

18. Булашев А.К., Турсунов К.А., Жумалин А.Х. Использование рекомбинантных белков Brucella для определения антител у серопозитивных животных // Вестник науки КазАТУ им. С.Сейфуллина.- 2017.- №1, Т.92.- стр.65-74; <https://bulletinofscience.kazatu.edu.kz/index.php/bulletinofscience/article/view/419/379>;

19. Булашев А.К., Турсунов К.Т., Каирова Ж.К., Сыздыкова А. Получение штамма продуцента рекомбинантного БМ19 Brucella abortus и изучение его антигенности // Вестник КазАТУ им.С.Сейфуллина.- 2018.-№3(98).-С.117-127; <https://bulletinofscience.kazatu.edu.kz/index.php/bulletinofscience/article/view/351/322>;

20. Булашев А.К., Акибеков О.С., Сураншиев Ж.А., Сыздыкова А.С., Іңірбай Б.Қ. Использование белковых антигенов в серодиагностике бруцеллеза крупного рогатого скота // 21.Вестник науки КазАТУ.- 2019.-№2(101).-С.92-102; <https://bulletinofscience.kazatu.edu.kz/index.php/bulletinofscience/article/view/257/234>;

22. Булашев А.К., Әкібеков Ө.С., Сұраншиев Ж.Ә., Сыздыкова Ә., Іңірбай Б. Вакцина егілген торпақтардың қан сарысуларындағы Brucella-ға телімді антиденелерді анықтау // Вестник науки КазАТУ.- 2020.-2(105).-С.181-189; <https://bulletinofscience.kazatu.edu.kz/index.php/bulletinofscience/article/view/115/99>;

Сведения о патентах руководителя проекта Булашева А.К. за последние 5 лет по тематике проекта;

1 Патент №33124 Республика Казахстан. МПК С12Т 15/00. Штамм микроорганизма E. coli BL21(DE3)/pET32/OmpVmBa продуцент рекомбинантного химерного белка внешней мембраны бруцелл / Булашев А.К., Турсунов К.А., Жумалин А.Х., Мукантаев К.Н.; заявитель и патентообладатель Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина.- 2017/0451.1; заявл. 25.05.2017; опубл.24.09.2018, Бюл.№36.-6 стр.

2 Патент №35776 Республика Казахстан. МПК С12Т 15/00. Штамм микроорганизма Escherichia coli BL21(DE3)/pET28/Omp19/31 - продуцент химерного рекомбинантного белка внешней мембраны бруцелл/ Булашев А.К., Акибеков О.С., Іңірбай Б.Қ., Мукантаев К.Н., Сыздыкова А.С., Сураншиев Ж.А., Турсунов К.А.; заявитель и патентообладатель Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина.- 2021/0301.1; заявл. 17.05.2021; опубл. 29.07.2022, Бюл. №30-8 стр.

Информация для потенциальных пользователей:

Внедрение «РНГА-набора...», изготовленного из отечественных составляющих, в диагностическую практику существенно повысит эффективность ветеринарных мероприятий за счёт простоты и низкой стоимости диагностикума, а рекомбинантные белки, впервые используемые мировой ветеринарной практике в качестве эритроцитарного антигена, позволят поднять специфичность серологических исследований, исключая ложноположительные результаты, свойственные классическим серологическим реакциям. Диагностикум может найти свое применение и в диагностике бруцеллеза у людей, тем окажет мультипликативный эффект в искоренении этой социально-опасной зоонозной инфекции.

Диагностика бруцеллеза, как и диагностика других особо опасных болезней животных, отнесена к государственной монополии, поэтому основными потребителями «РНГА-набора...» являются Республиканская ветеринарная лаборатория, ее областные и районные подразделения, а также Национальный референтный центр по ветеринарии Комитета ветеринарного контроля и надзора МСХ РК.

Дополнительная информация: мобильный телефон руководителя проекта: 8-701-516-84-06; электронная почта: aytbay57@mail.ru