

**Рыскельдина А. Ж.**, техника және технология ғылымдарының магистрі, докторант, **негізгі автор**, <https://orcid.org/0000-0002-7100-2711>

«С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ, Астана қ., Жеңіс даңғылы, 62, 010000, Қазақстан Республикасы, [anararyskeldina@gmail.com](mailto:anararyskeldina@gmail.com)

**Коробейников А. А.**, ветеринария маманы, <https://orcid.org/0000-0002-7320-5141>

«Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС, Астана қ., Қорғалжын тас жолы, 13/5, 010000, Қазақстан Республикасы, [korobeynikov.lab@gmail.com](mailto:korobeynikov.lab@gmail.com)

**Кадырова М. Е.**, ветеринария маманы, магистрант, <https://orcid.org/0000-0002-9079-8743>

«С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ, Астана қ., Жеңіс даңғылы, 62, 010000, Қазақстан Республикасы, [madina98\\_6@mail.ru](mailto:madina98_6@mail.ru)

**Камалова Д. К.**, техника және технология ғылымдарының магистрі, <https://orcid.org/0000-0002-8444-3305>

«Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС, Астана қ., Қорғалжын тас жолы 13/5, 010000, Қазақстан Республикасы, [kamalova@biocenter.kz](mailto:kamalova@biocenter.kz)

**Муханбеткалиев Е. Е.**, ветеринария ғылымдарының кандидаты, <https://orcid.org/0000-0003-3320-7182>

«С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университеті» КеАҚ, Астана қ., Жеңіс даңғылы, 62, 010000, Қазақстан Республикасы, [ersyn\\_1974@mail.ru](mailto:ersyn_1974@mail.ru)

**Куйбагаров М. А.**, ветеринария ғылымдарының кандидаты, <https://orcid.org/0000-0001-7428-7620>

«Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС, Астана қ., Қорғалжын тас жолы 13/5, 010000, Қазақстан Республикасы, [marat.kuibagarov@gmail.com](mailto:marat.kuibagarov@gmail.com)

**Шевцов А. Б.**, биология ғылымдарының кандидаты, доцент, <https://orcid.org/0000-0002-0307-1053>

«Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС, Астана қ., Қорғалжын тас жолы 13/5, 010000, Қазақстан Республикасы, [ncbshevtsov@gmail.com](mailto:ncbshevtsov@gmail.com)

**Ryskeldina A. Zh.**, master of Engineering and Technical Sciences, PhD student, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0002-7100-2711>

NCJSC «S. Seifullin Kazakh AgroTechnical Research University», Astana, Zhenis avenue, 62, 010000, Republic of Kazakhstan, [anararyskeldina@gmail.com](mailto:anararyskeldina@gmail.com)

**Korobeynikov A. A.**, specialist of veterinary sciences, <https://orcid.org/0000-0002-7320-5141>

National Center for Biotechnology, Astana, Kurgalzhynskoye road, 13/5, 010000, Republic of Kazakhstan, [korobeynikov.lab@gmail.com](mailto:korobeynikov.lab@gmail.com)

**Kadyrova M. Y.**, specialist of veterinary sciences, master's student, <https://orcid.org/0000-0002-9079-8743>

NCJSC «S. Seifullin Kazakh AgroTechnical Research University», Astana, Zhenis avenue, 62, 010000, Republic of Kazakhstan, [madina98\\_6@mail.ru](mailto:madina98_6@mail.ru)

**Kamalova D. K.**, master of Engineering and Technical Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-8444-3305>

National Center for Biotechnology, Astana, Kurgalzhynskoye road, 13/5, 01000, Republic of Kazakhstan, [kamalova@biocenter.kz](mailto:kamalova@biocenter.kz)

**Mukhanbetkaliyev Y. Y.**, candidate of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0003-3320-7182>

NCJSC «S. Seifullin Kazakh AgroTechnical Research University», Astana, Zhenis avenue, 62, 010000, Republic of Kazakhstan, [ersyn\\_1974@mail.ru](mailto:ersyn_1974@mail.ru)

**Kuibagarov M.A.**, candidate of veterinary sciences, <https://orcid.org/0000-0001-7428-7620>

National Center for Biotechnology, Astana, Kurgalzhynskoye road, 13/5, 010000, Republic of Kazakhstan, [marat.kuibagarov@gmail.com](mailto:marat.kuibagarov@gmail.com)

**Shevtsov A. B.**, candidate of biology sciences, associate professor, <https://orcid.org/0000-0002-0307-1053>

National Center for Biotechnology, Astana, Kurgalzhynskoye road, 13/5, 010000, Republic of Kazakhstan, [ncbshevtsov@gmail.com](mailto:ncbshevtsov@gmail.com)

***THEILERIA ANNULATA*-НЫҢ РЕКОМБИНАНТТЫ ПРОТЕИНИН АЛУ ЖӘНЕ ОНЫҢ  
ДИАГНОСТИКАЛЫҚ ҚҰНДЫЛЫҒЫН АНЫҚТАУ  
OBTAINING THE RECOMBINANT PROTEIN OF *THEILERIA ANNULATA* AND  
DETERMINING ITS DIAGNOSTIC VALUE**

### Аннотация

Ірі қара малдың тейлериозымен тиімді күресу үшін инфекцияның қолайлы аймақтарға таралуын болдырмау шаралары қажет. Бұл жағдайда сезімтал малға жүйелі және жеткілікті ауқымды серологиялық зерттеулер жүргізу маңызды мәселе болып табылады, ол үшін ветеринарлық мамандарда жоғары сезімтал және ерекше диагностикалардың болуы қажет.

Осы зерттеулер шеңберінде экспрессиялық векторлық жүйе құрылды және *Theileria annulata* (surface protein of *T. annulata*, *TaSP*) рекомбинантты беттік ақуызын тазарту және қайта өңдеу хаттамасы әзірленді. SDS-page тазартылған сынамаларды талдау молекулалық салмағы 32 кДа болатын *TaSP T. annulata* рекомбинантты ақуызының таза препараттарының жеткілікті жоғары өнімділігін көрсетті. Алынған рекомбинантты ақуыз полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісімен *T. annulata* ДНҚ-ың болуын анықталған қан плазмасы сынамаларындағы спецификалық антиденелерді анықтау үшін иммуноферментті талдау (ИФТ) хаттамасын оңтайландыру кезінде антиген ретінде пайдаланылды. Шартты оң және теріс үлгілердің іріктемесін сынау нәтижелері алынған рекомбинантты антигеннің серобелсенділігін және спецификасының жеткілікті жоғары деңгейін анықтады. Алдын ала алынған нәтижелер диагностикалық маңызын қосымша зерттеулерге және оны иммунологиялық тестілеу жүйелерінің құрамдас бөлігі ретінде пайдалану мүмкіндігін анықтауға пайдаланылатын ақуыздың маңыздылығын көрсетті.

### ANNOTATION

To efficiently combat bovine theileriosis, measures are needed to prevent the spread of infection to yet unaffected regions. An important point is conducting systematic and sufficiently large-scale serological studies of susceptible livestock, for which it is necessary for veterinary specialists to have highly sensitive and specific diagnostics.

Within the framework of these study, we created an expression vector system and developed a protocol for purification and refolding of the *Theileria annulata* recombinant surface protein (surface protein of *T.annulata*, *TaSP*). SDS-PAGE analysis of the purified samples showed a sufficiently high yield of pure preparations of the recombinant *TaSP* protein with a molecular weight of 32 kDa. The resulting recombinant protein was used as an antigen in optimizing the enzyme immunoassay protocol (ELISA) for the determination of specific antibodies in blood plasma samples in which the presence of *T.annulata* DNA was determined by polymerase chain reaction (PCR) beforehand. The results of testing of conditionally positive and negative samples determined the seroactivity and a sufficiently high level of specificity of the ELISA with obtained recombinant antigen. Preliminary results showed that the protein used is promising for further studies of diagnostic value and determining the possibility of its use as a component of immunological test systems.

**Түйін сөздер:** тейлериоз, *Theileria annulata* surface protein, *TaSP*, рекомбинантты ақуыз, иммуноферменттік талдау.

**Key words:** theileriosis, *Theileria annulata* surface protein, *TaSP*, recombinant protein, ELISA.

**Кіріспе.** *Theileria annulata* (*T. annulata*) тудыратын ірі қара мал тейлериозы бүкіл әлем бойынша, сонымен қатар, Қазақстанның оңтүстік өңірлерінде де мал шаруашылығына елеулі зиян келтіретін экономикалық маңызды инфекция болып табылады [1]. Әдетте, тейлериоз диагнозы лимфа түйіндерінің биоптаттарында Гимзаға боялған қан жағындылары мен макрошизонттардағы пироплазмаларды анықтауға негізделген. Алайда, бұл тесттердің сезімталдығы төмен болғандықтан паразитемия деңгейінің төмендігіне байланысты асимптоматикалық тасымалдаушыларды диагностикалауда тиімсіз болуы мүмкін. Молекулалық әдістер, мысалы, полимеразды тізбекті реакцияның (ПТР) әртүрлі нұсқалары, жоғары сезімталдыққа қарамастан, салыстырмалы түрде қымбат және зертханалық диагностиканы ұйымдастыруда талап етіледі [1]. Керісінше, серологиялық диагностикалық әдістер салыстырмалы түрде арзан, қолайлы және қолдануға ыңғайлы болып келеді.

Қазақстанда бойынша *Theileria annulata* (*T. annulata*) тудыратын тейлериоз Түркістан, Қызылорда, Алматы, Жамбыл облыстарында кеңінен тараған [2]. Инфекцияның жұғу пайызының жоғары болу салдарынан сырттан әкелінетін өнімділігі жоғары малдың ауруға төтеп беруін қиындатып, өлім-жітім деңгейі жоғары болуына әкеліп соғады. Бұл, әрине, мал шаруашылығының қарқындылығын тежейді [3]. *T. annulata* [4, 5, 6] тасымалдаушылары болып табылатын *Hyalomma* тұқымдасының кенелері Қазақстанның барлық дерлік өңірлерінде [7] тіркелгендіктен,

инвазияның жаңа өңірлерге таралу қаупі жоғары. Мұндай жағдайда қолайсыз аймақтардан көшіп келетін жануарларды міндетті түрде тексеруді тәжірибеге енгізу Қазақстанда тейлериоздың таралуын азайтады немесе бәсеңдетеді. Осыған байланысты жоғары спецификалық және сезімтал тестілеу әдістерін әзірлеу серологиялық әдістерге басымдықпен төмен шығындар мен жоғары өткізу қабілеттілігіне байланысты өзекті болып табылады.

Бұл жұмыстың мақсаты рекомбинантты *T. annulata* ақуызын алу және оның диагностикалық құндылығын иммуноферменттік талдау арқылы анықтау болды.

**Зерттеу материалдары мен әдістері.** Зерттеулер Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігінің «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС қолданбалы генетика зертханасының базасында жүргізілді.

Антиген ретінде *TaSP* ақуызының 26-дан 172 аминқышқылдарына дейінгі полиморфты аймағы таңдап алынды.

Әдеби деректерге сәйкес, бұл фрагмент иммунодоминантты және сезімтал және спецификалық ИФА тест жүйесін өндіру үшін жеткілікті [8]. Бұл *TaSP* фрагментін пайдалану гидрофобты трансмембраналық аймақтарды алып тастауға мүмкіндік береді, әйтпесе рекомбинантты ақуыздың ерігіштігіне теріс әсер етуі мүмкін. Ген фрагментін клондау үшін *in silico* праймерлері іріктелді, олардың көмегімен геномдық *T. annulata* ДНҚ-нан ұзындығы 441 жұп нуклеотид болатын фрагменті амплифицирленді және pET-19b векторына лигазасыз әдіспен клондалды. Алынған конструкция арқылы XL-Blue жасушаларын трансформацияладық. ПТР скринингі бойынша оң клон жасушаларынан B121(DE3) штаммының жасушалары түрлендірілген pET-19b *TaSP* плазмидасы бөліп алынды. Колониялар OD600 = 0,6-0,8 дейін өсірілді және экспрессия индукциясы жүргізілді. Индукциядан кейін дақылдарды центрифугалап, тұнба-80°C температурасында сақталды. Лизат алу үшін мұздатылған тұнба лизис буферінде қайта суспензияланды (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole pH 8.0), жасуша суспензиясына 1 мг/мл концентрацияға дейін лизоцим қосып, мұзда 20 минут инкубацияладық. Алынған ерітіндіні ультрадыбыспен өңдеп (импульстар арасында 10 секунд кідіріспен 200-300W қуаттылықта 10 секундтан 6 импульс) 15 минут 7000xg жылдамдықта центрифугаланды, супернатант металл-хелатталған хроматографияны қолдану арқылы одан әрі тазарту үшін пайдаланылды.

SDS-PAGE электрофорезі U. Laemmli әдісі бойынша 12% (PAGE) полиакриламидті гелінде жүргізілді [9].

Жұмыс барысында Қазақстанның тейлериоз бойынша қолайсыз өңірлеріндегі шаруашылықтарынан алынған ІҚМ-дың қан плазмасының сынамалары қолданылды, олардың тиісті үлгілерінен ПТР әдісі бойынша *T. annulata* ДНҚ-ның болуы немесе болмауы анықталды. Ол үшін *enolase* геніне таңдап алынған праймерлер қолданылды: Eno\_T.anul\_F 5'-ttcgagatggagacaaaagc-3' және Eno\_T.anul\_R 5'-tcagggtgtgataacttctgcc-3'. ПТР реакциясы 30 мкл және құрамында: әр праймердің 350 nM, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 200 μM әр dNTP, Taq DNA Polymerase (Синтол, Ресей) 1 U және ДНҚ 250 нг. ПТР күшейту бағдарламасы: ұзақ денатурация 95°C - 5 минут; 35 цикл 95°C - 30 секунд, 60°C - 40 секунд, 72°C - 50 секунд; соңғы созылу 72°C - 5 минут [10].

Нүктелік ИФТ (Dot-ELISA) жүргізу үшін Amersham TM protran TM 0.45 мкм нитроцеллюлоза стриптерінің бетіне (кат.№ A29795939) 6 концентрацияда (50 -0,00005 мкг/мл) 0.05% Tween 20 (TBS-T) бар трис-буферлік тұзды ерітіндіде 3 мкл рекомбинантты антиген қолданылды. Стриптер 37°C-10-15 мин температурада кептірілді. Бос жерлерді блоктау protein-Free™ блоктау буферінің (PBS, G-Biosciences, кат.№ 786-664) көмегімен шейкерде 37°C кезінде 2 сағат ішінде жүзеге асырылды. Оң және теріс плазма сынамалары TBS-T-де 1:100 қатынасында (көлемі 10 мл) жеке Петри табақшаларында сұйылтылды, онда антиген стриптері орналастырылды және шейкерде 2 сағат бойы 37 °C инкубацияланды.

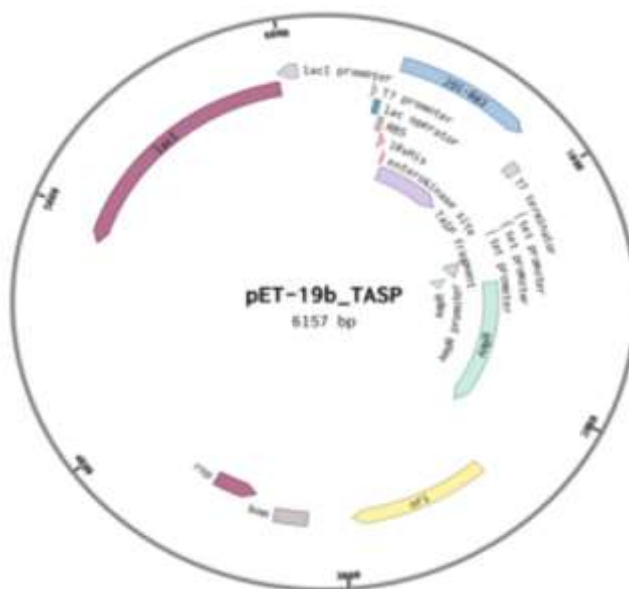
Стриптер TBS-T-мен жуылды, TBS-T-де 1:10000 қатынасында ферментпен таңбаланған қайталама антиденелердің ерітіндісін (Anti-bovine IgG HRP, Sigma, A5295) енгізді және шейкерде 1 сағат бойы 37 °C инкубацияланды. Стриптерді TBS-T жуып, субстрат - 1-Step™ Ultra TMB-Blotting Solution (Thermo Scientific, кат. № 37574) енгізілді. Реакция 10 минуттан кейін тазартылған сумен шаю арқылы тоқтатылды.

Имуноферменттік талдау жанама нұсқада жүргізілді. Протоколды оңтайландыру антигеннің үш концентрациясымен жүргізілді: pH 9.5 болатын 1, 2 және 4 мкг/мл карбонат-бикарбонат буферінде (КББ). Антиген планшеттің ұяшықтарына енгізіліп, түні бойы 4°C температурда инкубацияланды. Оңтайлы сұйылтуды анықтау үшін плазманың оң және теріс

үлгілері 1:100, 1:200, 1:600 арақатынасында фосфат-тұзды буферлік ерітіндіде сұйылтылды, рН 7.2 0.05% Tween 20 (ФТБ-Т). ИФТ қоюдағы соңғы нұсқа келесі нұсқа бойынша анықталды: иммунологиялық реакцияларға арналған 96 ұңғымалы планшеттің ұяшықтарына (nunc-Immuno MicroWell™ 96 well plates) КББ-ға антиген рН 9.5 (КББ) 2 мкг/мл концентрацияда енгізілді және түні бойы 4°C температурада инкубацияланды. Блоктау ерітіндісі ретінде фосфатты буферлі ерітіндісіндегі 5% құрғақ сүт қолданылды, рН 7.2 (ФСБ). Байланыспаған антигенді кетіру үшін планшет 3 рет жуылды, ФСБ-Т. Зерттелетін қан плазмасының сынамалары ФСБ-Т-да, 1:200 сұйылтуда, 60 минут ішінде 37°C инкубацияланды. Инкубациядан кейін планшет спецификалық емес түрде байланысқан антиденелерді кетіру үшін сипатталған әдіспен жуылды. Содан кейін 0,1 мл көлемінде 1:10000 қатынасында желкек пероксидазасымен (anti-bovine IgG HRP, Sigma, A5295) белгіленген түрге қарсы антиденелер планшеттің ұңғымаларына енгізіліп 37°C температурада 1 сағат бойы инкубацияланды. Байланысты емес реакция өнімдерін кетіру үшін жуу процедурасы қайталанды және ұяшықтарға тетраметилбензидин (ТМБ) ферменті субстратының 0,1 мл ерітіндісі енгізілді. Жуу процедурасы байланыспаған реакция өнімдерін жою үшін қайталанды және ұңғымаларға 0,1 мл тетраметилбензидин (ТМБ) ферментті субстрат ерітіндісі қосылды. Планшетті бөлме температурасында 10-15 минут инкубациялады. Оң реакция субстрат ерітіндісінің көк түске боялуымен сипатталады. Реакция планшеттің ұяшықтарына 1Н тұз қышқылының ерітіндісін қосу арқылы тоқтатылды. ИФТ нәтижелері толқын ұзындығы 450 нм (қосымша 630 нм) жарықтың тік сәулесі бар спектрофотометр көмегімен оқылды.

Жалған оң реакцияларды азайту үшін «cut off» көрсеткіші қан плазмасының 10 теріс сынамасы үшін алынған орташа OD мәнін және үш стандартты ауытқуды есептеу арқылы анықталды.

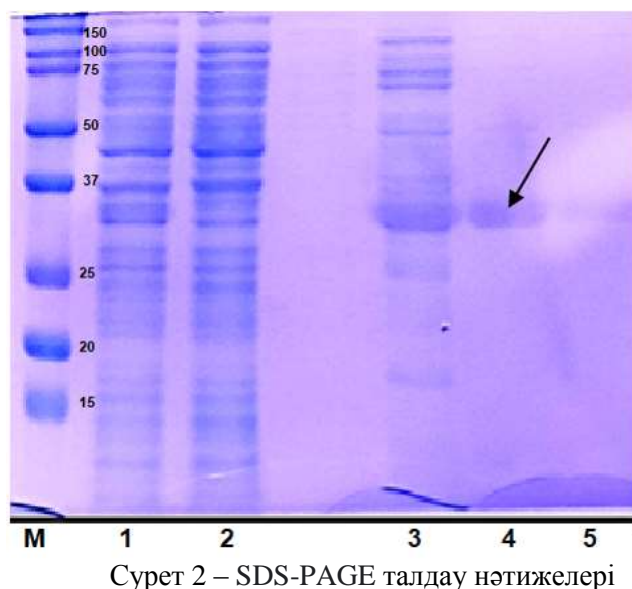
**Зерттеу нәтижелері.** *Рекомбинантты антиген алу.* Түркістан облысының ірі қара малдарынан алынған сынамалардың ДНҚ-нан 441 жұп нуклеотидтердің молекулалық салмағы бар фрагмент амплифицирленді. *T. annulata* ДНҚ-сы ПТР әдісі көмегімен анықталды. BLAST алгоритмі арқылы нуклеотидтер тізбегін тікелей секвенирлеу және кейінгі талдау оны *TaSP* генінің фрагменті ретінде анықтады. Алынған фрагмент рЕТ-19b\_TASP (6157 bp) экспрессиялық векторына сәтті клондалды (сурет 1).



Сурет 1 – *TaSP* антигенінің бактериялық экспрессиясына арналған плазида картасы

Трансформация және экспрессия нәтижесінде бактериялық лизатта молекулалық салмағы 32 кДа болатын мақсатты антиген өнімі анықталды, ал ақуыз еріген фракцияда қалды. Никель сефарозасы бар металл-хелатталған хроматографиямен тазарту 3 фракциядағы молекулалық салмағы 32 кДа (имидазолмен 250 мм элюция) *TaSP* *T. annulata* рекомбинантты ақуызының таза препараттарының жақсы өнімділігін көрсетті (сурет 2).

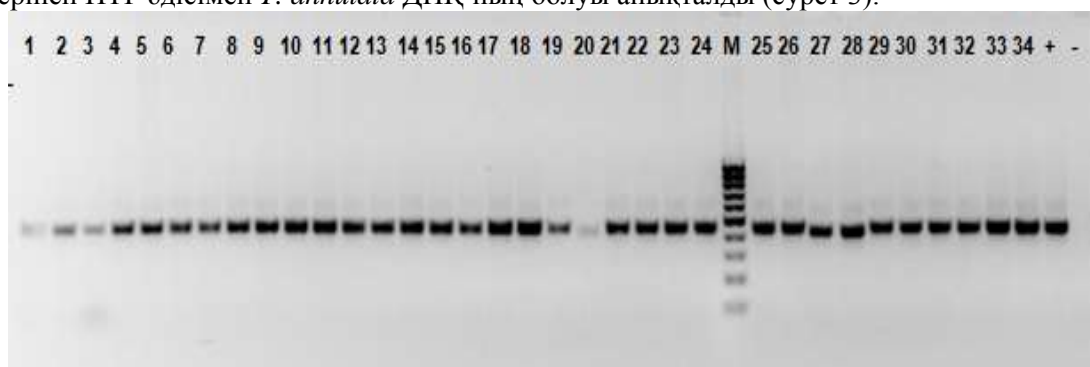




Сурет 2 – SDS-PAGE талдау нәтижелері

Ескертулер: M-Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, Cat.№ 1610394), 1 - лизат, 2 – flow-through, 3 – № 1 фракция, 4 – № 2 фракция, 5 – № 3 фракция. Көрсеткі мақсатты бенді көрсетеді.

Қан плазмасының үлгісін қалыптастыру. Тестілеу үшін Қазақстанның Түркістан облысы бойынша шаруашылықтардағы ІҚМ-дың қан плазмасынан 34 сынамасы алынды, олардың қан үлгілерінен ПТР әдісімен *T. annulata* ДНҚ-ның болуы анықталды (сурет 3).

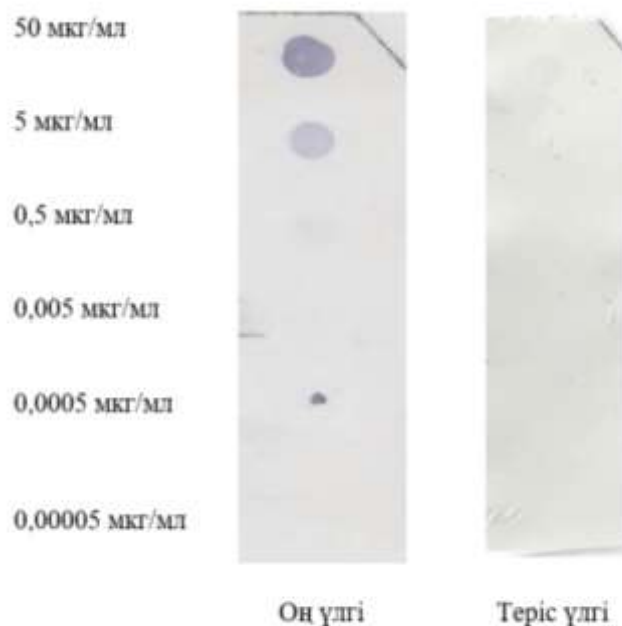


Сурет 3 – *T. annulata*-да ПТР талдауының нәтижелері

Сондай-ақ, Қостанай облысынан келген ІҚМ-дан алынған қан плазмасының 10 сынамасы теріс бақылау үлгісі ретінде пайдаланылды. Эпизоотиялық мәліметтерге сәйкес, жануарлар үнемі солтүстік аймақтың шаруашылығында ұсталды, бұл жануарларды *T. annulata*-ға тестілеу теріс нәтиже берді.

#### ИФТ әдісін оңтайландыру

Алынған антигеннің сероактивтілігін анықтау үшін Dot-Elisa жүргізілді. Оң нәтижелі үлгі ретінде ПТР әдісімен *T. annulata* ДНҚ анықталған қан плазмасының сынамасы қолданылды. Теріс үлгі ретінде *T. annulata*-да ПТР нәтижелері бойынша теріс қан плазмасының сынамасы қолданылды.



Сурет 4 – Dot-Elisa нәтижелері

4-суретте көрініп тұрғандай, рекомбинантты *TaSP* протеині, концентрациясы 5 мкг/мл Dot-ELISA-да антиген ретінде пайдаланған кезде, ІҚМ қан плазмасы сынамаларындағы *T. annulata* спецификалық антиденелерді анық анықтауға мүмкіндік береді.

Келесі кезеңде ИФТ-ның жанама нұсқасының параметрлері 96 ұңғымалы полистиролды планшет көмегімен оңтайландырылды. Плазма сынамаларындағы спецификалық антиденелердің деңгейін дұрыс анықтау үшін оптикалық тығыздықтың шекті деңгейін - "cut off" етіп орнату қажет. Осы мақсатта Қазақстанның пироплазмоз бойынша қолайлы өңіріндегі (Қостанай облысы) ІҚМ-дың қан плазмасынан алынған 10 сынама пайдаланылды. Теріс сынамалар сигналының орташа мәнін есептеу және стандартты ауытқуды есептеу нәтижесінде зерттелетін сынамалар сигналы 0,151-ден асқан кезде бұл сынаманы оң деп санауға болатындығы анықталды. ИФТ-дың жанама нұсқасындағы тестілеу нәтижелері кесте 1 келтірілген.

Кесте 1 – Сынамаларды тестілеу нәтижелері

№	ОТ (450/630 нм)	ПТР нәтижесі	ИФТ нәтижесі	№	ОТ (450/630 нм)	ПТР нәтижесі	ИФТ нәтижесі
1	0.249	+	+	23	0.245	+	+
2	0.294	+	+	24	0.432	+	+
3	0.229	+	+	25	0.351	+	+
4	0.261	+	+	26	0.677	+	+
5	0.212	+	+	27	0.629	+	+
6	0.213	+	+	28	0.198	+	+
7	0.174	+	+	29	0.088	+	-
8	0.180	+	+	30	0.277	+	+

9	0.138	+	-	31	0.558	+	+
10	0.159	+	+	32	0.081	+	-
11	0.390	+	+	33	0.249	+	+
12	0.776	+	+	34	0.288	+	+
13	0.253	+	+	35	0.032	-	-
14	0.587	+	+	36	0.048	-	-
15	0.625	+	+	37	0.026	-	-
16	0.325	+	+	38	0.048	-	-
17	0.271	+	+	39	0.066	-	-
18	0.468	+	+	40	0.134	-	-
19	0.540	+	+	41	0.076	-	-
20	0.169	+	+	42	0.059	-	-
21	0.312	+	+	43	0.04	-	-
22	0.374	+	+	44	0.03	-	-

Кесте 1 келтірілген мәліметтерден көрініп тұрғандай, антиген ретінде қолданылған рекомбинантты *TaSP* ақуызы сероактивті және қан үлгілеріндегі арнайы антиденелерді анықтауға мүмкіндік береді. Зерттелген 34 үлгі ПТР нәтижелері бойынша *T.annulata*-ға оң нәтиже берді, тек үш сынама ИФТ-да теріс деп анықталды.

**Қорытынды.** Осыған дейінгі ІҚМ тейлериозын серологиялық диагностикалауға арналған ИФТ әзірлеу бойынша жүргізілген жұмыстар, көбінесе, тазартылған шизонтты немесе пироплазмалық антигендерді қолдануға негізделген болатын [11]. Алайда, антигендерді стандарттаудағы қиындықтар, сезімталдық пен ерекшеліктің төмен көрсеткіштері ИФТ-ның осы бағытын кеңінен қолдануға мүмкіндік бермеді. Бұл мәселелер рекомбинантты антигендерді жасау арқылы шешілді [12, 13, 14].

Рекомбинантты нұсқаларды алудағы бірден-бір танымал мақсатты антигендердің бірі, спорозоит және шизонт сатыларында экспрессияланатын *Theileria annulata* (*Theileria annulata surface protein, TaSP*) беттік ақуызы болып табылады. *TaSP* жоғары иммуногенділікке ие, ал эпитоптар *TaSP* гендік тізбегінің полиморфты аймағында болады және әртүрлі *T. annulata* генотиптеріне ортақ [15, 16, 17].

Жүргізілген жұмыстың нәтижесінде рекомбинантты *TaSP* ақуызы синтезделіп, тазартылды.

Қолдану кезінде рекомбинантты *TaSP* протеині *T. annulata* спецификалық антиденелерін анықтауға мүмкіндік беретін Dot-Elisa хаттамасы анықталды. Теріс үлгіні пайдаланған кезде 50 мкг / мл концентрациясында антигенмен нүктеде байқалған төмен қарқындылық реакциясын экспрессиялық штаммның қалдық антигендерімен спецификалық емес антиденелер реакциясымен түсіндіруге болады. Мүмкін, *E. coli* антигендері бар зерттелетін үлгінің алдын-ала сіңу кезеңі фондық сигнал деңгейін төмендетуі мүмкін [18, 19, 20]. Стандарттау, сезімталдық және ерекшелік мәселелеріне қарамастан, бұл опция өте перспективалы және жеке сынамаларды сынау үшін пайдаланылуы мүмкін.

Қолдану барысында рекомбинантты *TaSP* ІҚМ қан плазмасының сынамаларында спецификалық антиденелермен әрекеттесетін ИФТ хаттамасы анықталды. Қолайсыз аймақтағы

жануарлардан алынған қан плазмасының 34 сынамасын салыстырмалы ИФТ талдауы арқылы зерттегенде, олардың толық қанында қолайлы аймақтан алынған 10 қан сарысуының және ПТР-да теріс үлгілері бар *Theileria annulata* бар екендігі анықталды, олардың дифференциациясын нақты жүргізуге және кесу мәнін анықтауға мүмкіндік берді.

Дегенмен, сынамалардың шектеулі үлгісін талдау және анықтамалық қан сарысулардың болмауы қолданылған рекомбинантты *TaSP* ақуызының диагностикалық құндылығы туралы белгілі бір қорытынды жасауға мүмкіндік бермейді. Ол үшін кеңейтілген метадеректері мен көбірек үлгілері бар іріктемелерді пайдалана отырып, қосымша зерттеулер жүргізу қажет. Алайда, ИФТ нәтижелері ПТР талдауының деректерімен байланыстыру, алынған антигеннің күмәнсіз перспективасы бар екенін атап өтеді және оның ерекшелігі мен сынақ жүйелерінің құрамдас бөлігі ретінде пайдалану мүмкіндігін зерттеу үшін қосымша зерттеулер қажет екендігі туралы айтады.

**Қаржыландыру көзі.** Зерттеулер 2022-2024 жылдарға арналған ғылыми және (немесе) ғылыми-техникалық жобалар бойынша гранттық қаржыландыру шеңберінде жүргізілді, ЖТН АР14869969.

#### ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1 Zhao, S. Evaluating an indirect rMPSP enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine *Theileria* infection in China [Text] / S. Zhao [and etc.] // *Parasitology Research*. - 2017. - Vol. 116. - P. 667-676.

2 Диков, Г. Справочник по паразитозам сельскохозяйственных животных в Республике Казахстан [Текст] / Г. Диков [и др.] // Алматы. - 1994. - Т. 1. - № 994. - С. 144-173.

3 Turganbayeva, G. Study of ixodid ticks on existence of blood parasites [Text] / G. Turganbayeva [and etc.] // *Journal of International Scientific Publications, Agriculture and Food*. - 2016. - Vol. 2. - P. 229-239.

4 Sang, C. Tick distribution and detection of *Babesia* and *Theileria* species in Eastern and Southern Kazakhstan [Text] / C. Sang [and etc.] // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. - 2021. - Vol. 12. - № 6. - P. 101817.

5 Guo, H. Molecular survey and characterization of *Theileria annulata* and *Ehrlichia ruminantium* in cattle from Northwest China [Text] / H. Guo [and etc.] // *Parasitology international*. - 2018. - Vol. 67. - № 6. - P. 679-683.

6 Yu, Z. Tick-borne pathogens and the vector potential of ticks in China [Text] / Z. Yu [and etc.] // *Parasites & vectors*. - 2015. - Vol. 8. - № 1. - P. 1-8.

7 Perfilyeva, Y. V. Tick-borne pathogens and their vectors in Kazakhstan—A review [Text] / Y. V. Perfilyeva [and etc.] // *Ticks and tick-borne diseases*. - 2020. - Vol. 11. - № 5. - P. 101498.

8 Seitzer, U. From molecule to diagnostic tool: *Theileria annulata* surface protein TaSP [Text] / U. Seitzer [and etc.] // *Parasitology research*. - 2007. - Vol. 101. - P. 217-223.

9 Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [Text] // *Nature*. - 1970. - Vol. 227. - № 5259. - P. 680-685.

10 Kuibagarov, M. *Theileria* and *Babesia* infection in cattle – First molecular survey in Kazakhstan [Text] / M. Kuibagarov [and etc.] // *Ticks and Tick-borne Diseases*. - 2023. - Vol. 14. - № 1. - P. 102078.

11 Manuja, A. Comparison of cellular schizont, soluble schizont and soluble piroplasm antigens in ELISA for detecting antibodies against *Theileria annulata* [Text] / A. Manuja [and etc.] // *Veterinary parasitology*. - 2000. - Vol. 87. - № 2-3. - P. 93-101.

12 Rajendran, C. Diagnosis of tropical bovine theileriosis by ELISA with recombinant merozoite surface protein of *Theileria annulata* (Tams1) [Text] / C. Rajendran [and etc.] // *Journal of parasitic diseases*. - 2014. - Vol. 38. - P. 41-45.

13 Prabhakaran, H.S. Evaluation of sporozoite and macroschizont antigen (Spm2) of *Theileria annulata* for its diagnostic potential [Text] / H.S. Prabhakaran [and etc.] // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. - 2021. - Vol. 12. - № 4. - P. 101691.

14 Tian, Z. Development of an indirect ELISA based on the recombinant Spm2 protein for detection of tropical theileriosis [Text] / Z. Tian [and etc.] // *Acta tropica*. - 2018. - Vol. 182. - P. 232-236.

15 Mohmad, A. Development of a recombinant TaSP-based Dot-ELISA for detection of *Theileria annulata* infection in cattle [Text] / A. Mohmad [and etc.] // *Ticks and tick-borne diseases*. - 2018. - Vol. 9. - № 6. - P. 1416-1420.



16 Elati, K. Sequence polymorphisms in a *Theileria annulata* surface protein (TaSP) known to augment the immunity induced by live attenuated cell line vaccine [Text] / K. Elati [and etc.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. - 2022.

17 Saaid, A.A. The protection afforded to cattle immunized with *Theileria annulata* infected cell line is enhanced by subunit vaccine candidate TaSP [Text] / A.A. Saaid [and etc.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. - 2020. - Vol. 67. - P. 26-34.

18 Gubbels, M. J. Development of an indirect Tams1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle [Text] / M. J. Gubbels [and etc.] // *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. - 2000. - Vol. 7. - № 3. - P. 404-411.

19 Jaramillo Ortiz, J.M. Development of an indirect ELISA based on a recombinant chimeric protein for the detection of antibodies against bovine babesiosis [Text] / J.M. Jaramillo Ortiz [and etc.] // *Veterinary Sciences*. - 2018. - Vol. 5. - № 1. - P. 13.

20 Lira-Amaya, J.J. Comparative Study of Indirect Fluorescent Antibody, ELISA, and Immunochromatography Tests for Serological Diagnosis of Bovine Babesiosis Caused by *Babesia bovis* [Text] / J.J. Lira-Amaya [and etc.] // *Animals*. - 2021. - Vol. 11. - № 12. - P. 3358.

## REFERENCES

1 Zhao, S. Evaluating an indirect rMPSP enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine *Theileria* infection in China [Text] / S. Zhao [and etc.] // *Parasitology Research*. - 2017. - Vol. 116. - P. 667-676.

2 Dikov, G. Spravochnik po parazitozam sel'skohozyajstvennyh zivotnyh v Respublike Kazakhstan [Text] / G. Dikov [and etc.] // *Almaty*. - 1994. - V. 1. - № 994. - P. 144-173.

3 Turganbayeva, G. Study of ixodid ticks on existence of blood parasites [Text] / G. Turganbayeva [and etc.] // *Journal of International Scientific Publications, Agriculture and Food*. - 2016. - Vol. 2. - P. 229-239.

4 Sang, C. Tick distribution and detection of *Babesia* and *Theileria* species in Eastern and Southern Kazakhstan [Text] / C. Sang [and etc.] // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. - 2021. - Vol. 12. - № 6. - P. 101817.

5 Guo, H. Molecular survey and characterization of *Theileria annulata* and *Ehrlichia ruminantium* in cattle from Northwest China [Text] / H. Guo [and etc.] // *Parasitology international*. - 2018. - Vol. 67. - № 6. - P. 679-683.

6 Yu, Z. Tick-borne pathogens and the vector potential of ticks in China [Text] / Z. Yu [and etc.] // *Parasites & vectors*. - 2015. - Vol. 8. - № 1. - P. 1-8.

7 Perfilyeva, Y. V. Tick-borne pathogens and their vectors in Kazakhstan—A review [Text] / Y. V. Perfilyeva [and etc.] // *Ticks and tick-borne diseases*. - 2020. - Vol. 11. - № 5. - P. 101498.

8 Seitzer, U. From molecule to diagnostic tool: *Theileria annulata* surface protein TaSP [Text] / U. Seitzer [and etc.] // *Parasitology research*. - 2007. - Vol. 101. - P. 217-223.

9 Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [Text] // *Nature*. - 1970. - Vol. 227. - № 5259. - P. 680-685.

10 Kuibagarov, M. *Theileria* and *Babesia* infection in cattle – First molecular survey in Kazakhstan [Text] / M. Kuibagarov [and etc.] // *Ticks and Tick-borne Diseases*. - 2023. - Vol. 14. - № 1. - P. 102078.

11 Manuja, A. Comparison of cellular schizont, soluble schizont and soluble piroplasm antigens in ELISA for detecting antibodies against *Theileria annulata* [Text] / A. Manuja [and etc.] // *Veterinary parasitology*. - 2000. - Vol. 87. - № 2-3. - P. 93-101.

12 Rajendran, C. Diagnosis of tropical bovine theileriosis by ELISA with recombinant merozoite surface protein of *Theileria annulata* (Tams1) [Text] / C. Rajendran [and etc.] // *Journal of parasitic diseases*. - 2014. - Vol. 38. - P. 41-45.

13 Prabhakaran, H.S. Evaluation of sporozoite and macroschizont antigen (Spm2) of *Theileria annulata* for its diagnostic potential [Text] / H.S. Prabhakaran [and etc.] // *Ticks and Tick-Borne Diseases*. - 2021. - Vol. 12. - № 4. - P. 101691.

14 Tian, Z. Development of an indirect ELISA based on the recombinant Spm2 protein for detection of tropical theileriosis [Text] / Z. Tian [and etc.] // *Acta tropica*. - 2018. - Vol. 182. - P. 232-236.

15 Mohmad, A. Development of a recombinant TaSP-based Dot-ELISA for detection of *Theileria annulata* infection in cattle [Text] / A. Mohmad [and etc.] // *Ticks and tick-borne diseases*. - 2018. - Vol. 9. - № 6. - P. 1416-1420.

16 Elati, K. Sequence polymorphisms in a *Theileria annulata* surface protein (TaSP) known to augment the immunity induced by live attenuated cell line vaccine [Text] / K. Elati [and etc.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. - 2022.

17 Saaid, A.A. The protection afforded to cattle immunized with *Theileria annulata* infected cell line is enhanced by subunit vaccine candidate TaSP [Text] / A.A. Saaid [and etc.] // *Transboundary and Emerging Diseases*. - 2020. - Vol. 67. - P. 26-34.

18 Gubbels, M. J. Development of an indirect Tams1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle [Text] / M. J. Gubbels [and etc.] // *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. - 2000. - Vol. 7. - № 3. - P. 404-411.

19 Jaramillo Ortiz, J.M. Development of an indirect ELISA based on a recombinant chimeric protein for the detection of antibodies against bovine babesiosis [Text] / J.M. Jaramillo Ortiz [and etc.] // *Veterinary Sciences*. - 2018. - Vol. 5. - № 1. - P. 13.

20 Lira-Amaya, J.J. Comparative Study of Indirect Fluorescent Antibody, ELISA, and Immunochromatography Tests for Serological Diagnosis of Bovine Babesiosis Caused by *Babesia bovis* [Text] / J.J. Lira-Amaya [and etc.] // *Animals*. - 2021. - Vol. 11. - № 12. - P. 3358.

### РЕЗЮМЕ

Для эффективной борьбы с тейлериозом крупного рогатого скота необходимы мероприятия по предотвращению распространения инфекции на благополучные регионы. В этой ситуации важным моментом является проведение систематических и достаточно масштабных серологических исследований восприимчивого поголовья, для чего необходимо наличие у ветеринарных специалистов высокочувствительных и специфичных диагностикумов.

В рамках данных исследований была создана экспрессионная векторная система и отработан протокол очистки и рефолдинга рекомбинантного поверхностного протеина *Theileria annulata* (surface protein of *T.annulata*, *TaSP*). SDS-PAGE анализ очищенных проб показал достаточно высокий выход чистых препаратов рекомбинантного белка *TaSP T. annulata* с молекулярной массой 32 кДа. Полученный рекомбинантный протеин был использован в качестве антигена при оптимизации протокола иммуноферментного анализа (ИФА) для определения специфических антител в пробах плазмы крови в которых методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), было определено наличие ДНК *T.annulata*. Результаты тестирования выборки условно **положительных и отрицательных проб**, определили сероактивность и достаточно высокий уровень специфичности полученного рекомбинантного антигена. Предварительные результаты показали перспективность использованного протеина для дополнительных исследований диагностической ценности и определения возможности его использования в качестве компонента иммунологических тест-систем.