REVIEW

of the dissertation of / ngirbai A. *Bakytkali* on the topic: "Usingmultiprotein recombinant antigen for serological diagnosis of brucellosis", submittedfor the academic degree of Doctor of Philosophy (PhD), Specialty 6D120l00 - "Veterinary Medicine"

Brucellosis is one of the most widespread zoonoses in the world, and in a number of countries, including the Republic of Kazakhstan (RK), the disease has become endemic. The main link in anti-epizootic measures is the timely detection of productive ruminants with brucellosis. Serological tests, such as Agglutination Test, Complement Fixation Test and Rose-Bengal Test, developed at the beginning and / or in the second half of the last century and used in the diagnosis of infection, do not reliably detect infected cattle and/or sheep, which is the main reason for the circulation of the pathogen in the environment.

These traditional tests are based on the detection of antibodies against the pathogen cell wall lipopolysaccharides, which does not exclude false positive results due to cross-reactions with related bacteria. Commercial ELISA kits available on the veterinary market are also based on the use of *Brucella* spp. polysaccharide antigens. Therefore, the development of tests based on the use of a specific antigen and allowing to avoid cross-reactions with closely related bacteria is one of the urgent tasks of veterinary science not only in the RK, but also in other countries endemic for brucellosis.

Among the nonpolysaccharide *Brucella* cell components that can minimize cross-reactions are proteins, including outer membrane proteins (Omps). Advances in genetic engineering have also eliminated difficulties in antigen preparation and the biohazard risks associated with cell culture and opened up new prospects for the study of *Brucella* recombinant Omps (rOmps) diagnostic value. A review of the world literature in the field of improving the diagnosis of brucellosis shows that the use of a single romps provides the specificity for indirect ELISA but significantly reduces its sensitivity. The combined use of *Brucella* rOmps imparted a higher sensitivity to the assay in testing brucellosis positive blood serum samples. However, the use of several single proteins as an antigen leads to an increase in the cost of diagnostic tests. Thus, a chimeric (fusion) antigen comprising the most diagnostically important regions of several proteins and synthesized by a single producer strain would provide high accuracy for the analysis and the relative cheapness of a diagnostic kit.

The dissertation (thesis) of B. Ingirbay aims to obtain *Brucella* spp. recombinant chimeric Omps - producing strains of *E. rofi,* and to study the value of target products as antigens in ELISA for serological diagnosis of cattle and sheep brucellosis. Three types of antigen, each comprising the immunodominant regions of two *Brucella* Omps, were successfully expressed in *E. coli* BL2l (DE3) cells using the pET28 plasmids and their efficacy was assessed in an attempt to increase the sensitivity of the i-ELISA for serological diagnosis of bovine and sheep brucellosis. These chimeric proteins, designated rOmp19 + 25, rompl9 +

31, and rOmp25 + 31 were composed of active serological parts of *Brucella* spp. Omps with molecular weights of 19 kDa, 25 kDa, and 31 kDa. The results showed that chimeric rOmp 19 + 31 has pronounced immunoreactive properties compared to other proteins used, and might be used in the serological diagnosis of animal brucellosis.

The scientific novelty of the dissertation work lies in the fact that for the first time a prokaryotic producer strain synthesizing a chimeric protein consisting of immunodominant fragments of *Brucella* Omps with molecular weights of 19 kDa and 31 kDa was obtained, and this chimerie antigen was used in the development of a sensitive and specific ELISA for serological testing of cattle and sheep. The strain-producer of the chimeric protein is recognized as an invention and protected by a patent of the RK.

The thesis is a complete independent research work containing a new solution to one of the important tasks of veterinary science and has practical value. The novelty of the results allows further study on the commercialization of the experimental ELISA kit.

In the course of implementing the tasks of the dissertation, the academic degree applicant has sufficiently mastered modern methodology and methods of scientific analysis, acquired the skills to conduct in-depth scientific research in the field of immunology and genetic engineering.

The results of the dissertation work were presented at three international conferences, and were also reported at the First China-Kazakhstan Veterinary Medicine Science and Technology Postgraduate Academic Forum (May 28, 2022). The main results of the thesis were published in three articles included in the Scopus database.

I believe that Ingirbai K. Bakytkali, an applicant for the academic degree of PhD, deserves to be awarded the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in the specialty 6D120100 - Veterinary Medicine.

Xiaojun Wang, foreign scientific consultant,
PhD, Professor, Harbin Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences Xiaojun Wang

stamped signature

6D120100 – «Ветеринарлық медицина» мамандығы бойынша
философия докторы (PhD) ғылыми дәрежесін
алуға ұсынылған «Мультипротеинді рекомбинант антигенін бруцеллездің серологиялық
балауында қолдану» тақырыбындағы Бақытқали Іңірбайдың диссертациясына
ПІКІР

Бруцеллез әлемдегі ең көп таралған зооноздардың бірі болып табылады, ал бірқатар елдерде, оның ішінде Қазақстан Республикасында (ҚР) ауру эндемиялық сипатқа ие болды. Эпизоотияға қарсы іс-шаралардың негізгі буыны бруцеллезбен ауыратын өнімді күйіс қайыратын жануарларды уақтылы анықтау болып табылады. Агглютинация реакциясы, комплемент байланыстыру реакциясы және Роз Бенгал сынамасы сияқты серологиялық сынақтар өткен ғасырдың басында және/немесе екінші жартысында дамыған және инфекцияны диагностикалау кезінде қолданылатын жұқтырған ірі қара малды және / немесе қойларды сенімді түрде анықтауға мүмкіндік бермейді, және бұл қоршаған ортадағы қоздырғыштың айналымының негізгі себебі болып табылады.

Бұл дәстүрлі сынақтар патогеннің жасуша қабырғасының липополисахаридтеріне қарсы антиденелерді анықтауға негізделген, және ол байланысты бактериялармен айқаспалы реакцияларға байланысты жалған оң нәтижелерді жоққа шығармайды. Ветеринарлық нарықта қол жетімді коммерциялық ИФТ жинақтары сонымен қатар Brucella spp полисахаридті антигендерді қолдануға негізделген. Сондықтан нақты антигенді қолдануға негізделген және бір-бірімен тығыз байланысты бактериялармен айқаспалы реакцияларды болдырмауға мүмкіндік беретін сынақтарды әзірлеу тек ҚР-да ғана емес, сонымен қатар бруцеллезге эндемикалық басқа елдерде де ветеринария ғылымының өзекті міндеттерінің бірі болып табылады.

Айқаспалы реакцияларды азайта алатын Brucella жасушаларының полисахаридті емес компоненттерінің арасында ақуыздар, соның ішінде сыртқы мембрананың ақуыздар (Omps) бар. Гендік инженериядағы жетістіктер сонымен қатар антигенді дайындаудағы қиындықтарды және жасушалар өсіндісіне байланысты биологиялық қауіптерді жойды және Brucella-ның сыртқы мембрананың рекомбинантты ақуыздарының (rOmps) диагностикалық құндылығын зерттеудің жаңа перспективаларын ашты. Бруцеллез диагностикасын жетілдіру саласындағы әлемдік әдебиеттерге шолу сыртқы мембрананың бір рекомбинантты ақуызын пайдалану жанама ИФТ арнайылылығын қамтамасыз ететінін, бірақ оның сезімталдығын айтарлықтай төмендететінін көрсетеді. Brucella сыртқы мембранасының рекомбинантты ақуыздарын ортақ пайдалану бруцеллезге оң қан сарысуының үлгілерін зерттеу кезінде талдауға жоғары сезімталдық берді. Алайда, антиген ретінде бірнеше жеке ақуыздарды қолдану диагностикалық сынақтардың қымбаттауына әкеледі. Осылайша, бірнеше ақуыздардың диагностикалық жағынан ең маңызды аймақтарын қамтитын және бір штамм түзушімен синтезделген жасанды (біріктірілген) антиген талдаудың жоғары дәлдігін және диагностикалық жинақтың салыстырмалы арзандығын қамтамасыз етеді.

Б. Іңірбайдың диссертациялық жұмысы Brucella spp өндіретін E. rofi штаммдарының сыртқы мембраналарының рекомбинантты жасанды ақуыздарын алуға және ірі қара мал мен қой бруцеллезін серологиялық диагностикалау үшін ИФТ - да антигендер ретінде мақсатты өнімдердің маңыздылығын зерттеуге бағытталған. Әрқайсысы Brucella сыртқы мембранасының екі ақуызының иммунодоминантты аймақтарын қамтитын антигендердің үш

түрі pET28 плазмидасын пайдаланып E. coli BL21 (DE3) жасушаларында сәтті экспрессияланды және олардың тиімділігі ірі қара мал мен қой бруцеллезін серологиялық диагностикалау үшін жанама ИФТ сезімталдығын арттыру мақсатында бағаланды. rOmp19 + 25, romp19 +31 және rOmp25 + 31 деп белгіленген бұл жасанды ақуыздар 19 кДа, 25 кДа және 31 кДа молекулалық массалары бар Brucella spp сыртқы мембранасының ақуыздарының белсенді серологиялық бөліктерінен тұрды. Нәтижелер жасанды rOmp 19 + 31 басқа пайдаланылған ақуыздармен салыстырғанда айқын иммунореактивті қасиеттерге ие екенін және жануарлардың бруцеллезінің серологиялық диагностикасында қолдануға болатынын көрсетті.

Диссертациялық жұмыстың ғылыми жаңалығы - алғаш рет 19 кДа және 31 кДа молекулалық салмағы бар Brucella сыртқы мембрананың ақуыздарының иммунодоминантты фрагменттерінен тұратын жасанды ақуызды синтездейтін прокариоттық штамм түзіші алынды және бұл жасанды антиген ірі қара мал мен қойларды серологиялық сынау үшін сезімтал және арнайы ИФТ әзірлеу кезінде пайдаланылды. Жасанды ақуызының штамм түзушісі өнертабыс болып танылады және ҚР патентімен қорғалады.

Осы диссертация ветеринарияның маңызды міндеттерінің бірінің жаңа шешімін қамтитын және практикалық құндылығы бар аяқталған дербес ғылыми жұмыс болып табылады. Алынған нәтижелердің жаңалығы тәжірибелік ИФТ жиынтығын коммерцияландыру бойынша зерттеулерді жалғастыруға мүмкіндік береді.

Диссертацияның міндеттерін іске асыру барысында ғылыми дәрежесін ізденуші ғылыми талдаудың заманауи әдіснамасы мен әдістерін жеткілікті дәрежеде игерді, иммунология және гендік инженерия саласында терең ғылыми зерттеулер жүргізу дағдыларын игерді.

Диссертациялық жұмыстың нәтижелері үш халықаралық конференцияда ұсынылды, сондай-ақ Ветеринариялық медицина аспиранттарының бірінші Қытай-Қазақстан ғылыми-техникалық форумында баяндалды (2022 жылғы 28 мамыр). Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері Scopus дерекқорына енгізілген үш мақалада жарияланды.

PhD дәрежесін ізденуші Бақытқали Қ. Іңірбай 6D120100 - Ветеринариялық медицина мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алуға лайық деп санаймын.

Сяоцзюнь Ван, шетелдік ғылыми кеңесші,
PhD докторы, профессор, Харбин ветеринарлық
ғылыми-зерттеу институты, Қытай ауылшаруашылық
ғылымдары академиясы /қолы/

мөрмен бекітілген қолтаңба

Смысл и последствия совершенного нотариального действия мне нотариусом разъяснены. При подписании настоящего документа я подтверждаю, что в дееспособности не ограничен(а), не нахожусь в состоянии наркотического, токсического, алкогольного опьянения, по состоянию здоровья могу осуществлять и защищать свои права и исполнять обязанности, не страдаю заболеваниями, могущими препятствовать осознанию сути подписываемого документа. Подтверждаю, что владею языками, которые используются при переводе, мне разъяснены положения законодательства об ответственности за заведомо неправильный перевод и требования о сохранении в тайне ставших известными сведений.

Согласно статье 79, ч. 2 Закона Республики Казахстан «О нотариате», нотариус, свидетельствуя подлинность подписи, не удостоверяет фактов, изложенных в документе, а лишь подтверждает, что подпись сделана определенным лицом.

Подпись Жеренкенова Мадина Ойратовна

Республика Казахстан, город Астана, девятое ноября две тысячи двадцать второго года. Я, Оспанова Жанар Муканбетжановна, частный нотариус города Астана, государственная лицензия № 0000792 от 04.08.2000 года, выдана Министерством юстиции Республики Казахстан, свидетельствую подлинность подписи, сделанной переводчиком **Жеренкеновой Мадиной Ойратовной**, с английского языка на казахский язык на тексте документа. Личность переводчика установлена, дееспособность и полномочия переводчика проверены.

Зарегистрировано в реестре за № 2695
Взыскано согласно, ст.30 п.2
и ст.30-1 Закона РК «О нотариате».

Нотариус _____

09-11-2022

Настоящий документ был переведен компетентным переводчиком **ИП «Агентство переводов «STAR Translations»» Жеренкеновой Мадиной Ойратовной**

ET740050222110913511OS985700

Нотариаттық іс-әрекеттің бірегей нөмірі / Уникальный номер нотариального действия