

УДК: 616.982.27:579.841.11[Pseudomonas]-076

АНАЛИЗ АНТИГЕННОГО СОСТАВА ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТТИНГА СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ КРОЛИЧЬИМИ СЫВОРОТКАМИ ПРОТИВ ЖИВЫХ КЛЕТОК, КЛЕТОЧНЫХ И ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ

А.А. Будченко, И.Ю. Мазурова

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград

Иммуноблоттинг суммарных клеточных белков с сыворотками к живым клеткам и клеточным протеинам позволил выявить у патогенных буркхольдерий антигены (молекулярная масса 20, 60, 88 kDa), которые вызывают секрецию антител независимо от варианта иммунизации и предположительно располагаются на поверхности клеток.

Ключевые слова: иммуноблоттинг, буркхольдерии, мелиоидоз.

ANALYSIS OF ANTIGEN STRUCTURE BY IMMUNOBLOTTING METHOD WITH SPECIFIC RABBIT SERA AGAINST LIVE CELLS, CELLULAR AND EXTRACELLULAR ANTIGENS OF PATHOGENIC BURKHOLDERIAS

A.A. Budchenko, I.Yu. Mazurova

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd

Immunoblotting of total cellular proteins with sera to live cells and cellular proteins permitted to reveal antigens (molecular weight 20, 60, 88 kDa) in pathogenic burkholderias caused secretion of antibodies independently of an immunization variant and presumably located on cell surfaces.

Key words: immunoblotting, burkholderia, melioidosis.

Актуальность точной и своевременной диагностики сапа и мелиоидоза обусловлена возможностью завоза возбудителей этих инфекций в Россию из стран, где они являются эндемичными. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) по-прежнему в этих странах считаются основными диагностическими методами мониторинга сапа и мелиоидоза [4]. При этом чувствительность и специфичность методов зависит от антигенов, используемых для сенсibilизации эритроцитов (РНГА) и поливинилхлоридных пластин (ТИФА). До настоящего времени добиться 100 % значений названных характеристик не удалось. Поэтому поиск антигенов, при использовании которых обеспечиваются необходимые максимальные чувствительность и специфичность, является актуальным.

Цель работы – провести сравнительный анализ состава иммуногенных антигенов патогенных буркхольдерий методом иммуноблоттинга со специфическими кроличьими сыворотками, полученными иммунизацией животных живыми клетками, клеточными и экстрацеллюлярными антигенами (ЭЦА).

Материалы и методы

В работе использовали типичные штаммы видов *Burkholderia pseudomallei* C-141, *B. pseudomallei* 107 (авирулентный), *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416 из коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Для решения поставленной задачи реализовывали алгоритм: фракционировали суммарные клеточные белки взятых в работу штаммов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ) и проявляли их на геле: а) окрашиванием Кумасси G-250, б) обработкой иммунными сыворотками (иммуноблоттинг). Затем сопоставлением электрофореграмм суммарных клеточных белков (после окраски Кумасси G-250) и антигенов (после иммуноблоттинга) выявляли и оценивали иммуногенные белковые фракции.

Сыворотки получали путем иммунизации кроликов: а) живыми клетками *B. pseudomallei* 107 (10^9 м.к./мл животным вводили подкожно), через семь суток – указанный корпускулярный антиген вводили повторно, и ещё через 14 суток – внутривенно; б) цельноклеточными и экстрацеллюлярными

антигенами *B. pseudomallei* C141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416 (1 мг/мл) в смеси с неполным адъювантом Фрейнда («Calbiochem», США) в соотношении 1:1. Иммунизацию антигенной смесью осуществляли в/к вдоль позвоночника в 10 точек четырехкратно с интервалом в семь дней [1]. Цельноклеточные антигены (супернатант) получали после ультразвуковой обработки суспензии бактериальной массы в 0,15 М NaCl (pH 7,2) и центрифугирования (10000 g, 25 мин). Для получения ЭЦА бактериальную массу, росшую в течение 18 часов на агаре, покрытом целлофаном, смывали раствором 0,15 М NaCl, центрифугировали (15000 g 25 мин). Супернатант фильтровали (размер пор фильтра 0,45 мкм). ЭЦА осаждали из суспензии охлажденным ацетоном (-30°C) в соотношении 1:3 [1]. Кровь отбирали при титрах сывороток в реакции иммунодиффузии 1:32. Электрофорез в ПААГ с SDS ставили по Laemmli в вертикальных пластинах (14x16 см) [3]. Пробы получали путем обработки бактериальной массы лизирующим раствором (0,0625 М Трис-Cl, pH 8, 1 % ДСН, 10% глицерола, 5 % 2-меркаптоэтанола). Нагрузка на трек составляла 12 мкг антигена. Концентрацию протеина измеряли методом Бредфорда. Одну часть геля после электрофореза окрашивали раствором Кумасси G-250, вторую часть переносили на мембрану (размер пор 0,45 мкм). Фракции антигенов выявляли иммуноферментным методом, используя полученные сыворотки и меченные пероксидазой хрена антитела против кроличьих иммуноглобулинов («Медгамал», Россия) в разведении 1:8000 [5]. В качестве субстрата применяли тетраметилбензидин.

Результаты и обсуждение

Визуально было выявлено на протеинограммах после электрофореза в ПААГ с ДСН от 32 до 36 фракций, на электрофореграммах после иммуноблоттинга с сыворотками к цельноклеточным антигенам 31-32 фракции, на электрофореграммах после иммуноблоттинга с иммунными сыворотками к живым клеткам 21-24 фракции. Также на электрофореграммах были подсчитаны крупные «мажорные» фракции.

Сравнительный анализ полученных спектров фракций суммарных белков (окраска Кумасси G-250) и спектра антигенных фракций после иммуноблоттинга с сывороткой к цельноклеточным белкам показал, что большинство белковых фракций иммуногенны. Однако не всегда крупные фракции на электрофореграммах (окраска Кумасси G-250) обеспечивают столь же значительную фракцию на электрофореграммах после иммуноблоттинга. Так, мажорная фракция с молекулярной массой 29 кДа на иммуноэлектрофореграмме имеет фракцию с низкой интенсивностью окраски. В тоже время фракция с низкой интенсивностью окраски на протеинограмме с молекулярной массой 20 кДа имеет высокую интенсивность окрашивания на иммуноэлектрофореграммах.

Также наблюдаются отличия в составе антигенных фракций сравниваемых штаммов буркхольдерий на иммуноэлектрофореграммах после иммуноблоттинга с сыворотками к цельноклеточным белкам. Используя компьютерные программы цифровой обработки и кластерного анализа по этим признакам, возможна дифференциация видов.

Сравнительный анализ полученных спектров фракций суммарных белков (окраска Кумасси G-250) и спектра антигенных фракций после иммуноблоттинга с сывороткой к живым клеткам позволил выявить иммуногенные фракции, не обладающие большим количеством белка (20 и 88 кДа). Anuntagool N. с соавт. (1993 г.) сообщали о применении фракции 20 кДа для сенсибилизации ячеек пластин в ТИФА при диагностике мелиоидоза, что обеспечивало в этом методе чувствительность – 92 %, специфичность – 91 % [2]. В тоже время видно, что антигены мажорной фракции 88 кДа вызывают образование соответствующего количества антител, которое и обеспечивает образование на протеинограмме после иммуноблоттинга мажорную фракцию. Такие различия в иммуногенности, возможно, связаны с тем, что при введении живых клеток в организм животного, антитела в большем количестве образуются к антигенам или их эпитопам, расположенным на поверхности клеток и с тем, что не происходит глубокой деструкции клеток возбудителя мелиоидоза в организме иммунизированного животного. Аналогичные результаты были получены и с сыворотками к клеточным и ЭЦА антигенам других изучаемых нами буркхольдерий.

Таким образом, применение иммуноблоттинга и сывороток к живым клеткам и клеточным антигенам позволило выявить у патогенных буркхольдерий комплекс антигенов, которые вызывают ответ животного – секрецию антител независимо от варианта иммунизации.

Литература

1. Будченко А.А., Мазурова И.Ю., Илюхин В.И. Исследование внеклеточных антигенов иммунодиффузионными методами в дифференциации патогенных буркхольдерий. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2012. – Вып. 1. – С. 54-60.
2. Anuntagool N., Rugdech P., Sirisinhal S. Identification of Specific Antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and Evaluation of Their Efficacies for Diagnosis of Melioidosis. // J. of clinical microbiology. – 1993. – P. 1232-1236.
3. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage

T4 / U.K Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – № 15. – P. 680-685.

4. Sermiswan R.W., Wongratanacheewin S., Anuntagool N. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. // J. Trop Med Hyg. – 2000. – 63:146-149.

5. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – 76:4350-4354.

Ответственный автор

Будченко Анатолий Александрович – старший научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 579.841.11Pseudomonas:57.063-8:615.33

ИЗМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ ПРИ ПАССИРОВАНИИ НА ЖИВОТНЫХ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Т.В. Сенина, Е.В. Илюхин, Е.В. Шубникова

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Волгоград

В процессе пассирования шести штаммов *Burkholderia pseudomallei*, четырех – *B. mallei* и пяти – *B. thailandensis* на животных и питательных средах менялись морфология колоний и вирулентность культур. Антибиотикочувствительность культур, пассированных на животных, имеет тенденцию к повышению, а после пассажа на питательных средах отмечено разнонаправленное изменение резистентности. Повышение вирулентности культур ведет к стабилизации морфологии колоний и в большинстве своем снижает их устойчивость к антибактериальным препаратам.

Ключевые слова: буркхольдерии, вирулентность, антибиотики.

CHANGING OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY IN PATHOGENIC BURKHOLDERIA STRAINS BY PASSAGING TO ANIMALS AND NUTRIENT MEDIA

T.V. Senina, E.V. Ilyukhin, E.V. Shubnikova

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd

Colony morphology and culture virulence has changed at passage of 6 *Burkholderia pseudomallei*, 4 - *B. mallei* and 5 - *B. thailandensis* strains to animals and nutrient media. Antibiotic sensitivity of cultures passed to animals tended to increase but after a passage to nutrient media was noted differently directed change of resistance. Increase of culture virulence caused stabilization of colony morphology and in most cases reduced resistance to antibacterial preparations.

Key words: *Burkholderia*, virulence, antibiotics.

Три вида бактерий рода *Burkholderia* – *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* являются филогенетически родственными микроорганизмами, близкими по своим фенотипическим и генотипическим свойствам [1, 2, 4]. При этом данные виды буркхольдерий существенно отличаются по своей патогенности для человека и животных. *B. mallei* является возбудителем сапа, это сформированный