

УДК 619:578.832.1

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ АНАЛИЗА АНТИГЕННОГО СОСТАВА *BORDETELLA BRONCHISEPTICA***Васильева Ю.Б.***ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина», Ульяновск, e-mail: grant-ugsha@yandex.ru*

Целью данного исследования явилось проведение сравнительного анализа различных иммунохимических методов, отличающихся друг от друга технологическими приемами для выбора оптимальной схемы анализа антигенного состава *B. bronchiseptica*. Установили, что иммунохимические методы являются достаточно эффективными и позволяют в короткие сроки провести анализ антигенного состава *B. bronchiseptica*. Использование двойной радиальной иммунодиффузии позволяет обнаружить 5 антигенов *B. bronchiseptica*, 3 из которых дают перекрёстную реакцию с *B. parapertussis*, 2 – являются видоспецифичными. Встречный электрофорез не дает возможности провести видовую идентификацию антигенов *B. bronchiseptica*. Метод иммуноэлектрофореза выявляет 8 антигенных комплексов, 5 из которых являются видоспецифичными для *B. bronchiseptica*. В результате сравнительного анализа трех иммунохимических методов установили, что наиболее эффективным является иммуноэлектрофорез. Предлагаемая нами схема анализа антигенной структуры *B. bronchiseptica* включает: извлечение антигенов ультразвуковой дезинтеграцией, получение иммунной сыворотки гипериммунизацией лабораторных животных и проведение реакции иммуноэлектрофореза.

Ключевые слова: *Bordetella bronchiseptica*, бордетеллёз, лабораторная диагностика, иммунохимические методы**EFFECTIVENESS OF IMMUNOCHEMICAL METHODS FOR THE ANALYSIS OF THE ANTIGENIC COMPOSITION OF *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*****Vasileva Y.B.***FSBEI HPE «Ulyanovsk SAA named after P.A. Stolypin», Ulyanovsk, e-mail: grant-ugsha@yandex.ru*

The aim of this study was to conduct a comparative analysis of different immunochemical methods, which differ from each other by technological methods for the selection of an optimal scheme for the study of the antigenic composition of *B. bronchiseptica*. It is established that immunochemical methods are quite effective and allow, in short terms, to conduct analysis of the antigenic composition of *B. bronchiseptica*. The use of double radial immunodiffusion can detect 5 antigens *B. bronchiseptica*, 3 of which enable cross-react with *B. parapertussis*, 2 – are species-specific. Counter electrophoresis does not allow for species identification of antigens *B. bronchiseptica*. Method immunoelectrophoresis identifies 8 antigen complexes, of which 5 are species-specific for *B. bronchiseptica*. According to the comparative analysis of the three immunochemical methods, the most effective is immunoelectrophoresis. The proposed scheme for the analysis of the antigenic structure of *B. bronchiseptica* includes: getting the antigens ultrasonic disintegration, obtaining immune serum by hyperimmunization of laboratory animals and the realization of reaction of immunoelectrophoresis.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, bordetelesis, laboratory diagnostics, immunochemical methods

В связи с тем, что возбудитель бордетеллеза, коклюшеподобного заболевания животных, в нашей стране недостаточно изучен, заслуживает внимания поиск эффективных методов анализа антигенной структуры *B. bronchiseptica*, а также разработка быстрых и точных методов выделения и идентификации инфекционного агента.

Большинство исследователей описывают эксперименты, касающиеся антигенных различий трех генетически близкородственных представителей бордетелл: *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis*. Зарубежными авторами в реакциях агглютинации и преципитации исследованы термолабильные токсины, капсульные агглютиногены, эндотоксины, гемагглютинин, гистамин-чувствительный фактор, идентифицированы 14 различных антигенов представителей рода *Bordetella* [4, 5, 6, 8].

R. Ross et al. в 1969 году исследовали антигенный состав *B. bronchiseptica*,

B. pertussis и *B. parapertussis* с помощью методов диффузной преципитации в агаровом геле и иммуноэлектрофореза в барбитуратовом буфере. Авторы установили, что три антигена являются общими [8].

N. Holby et al. методом иммуноэлектрофореза регистрировали перекрестные реакции между антигенами *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* и *B. pertussis* в широком диапазоне [5].

Экспериментально А.Р. MacLennan обнаружил, что липополисахарид, являющийся протективным антигеном, в реакциях микроагглютинации и радиальной иммунодиффузии по О. Ouchterlony был идентичен таковым, выделенным из бактерий кишечной группы [6].

Несоответствие данных различных авторов и отсутствие стандартных методик изучения антигенного состава *B. bronchiseptica* подтолкнуло нас к проведению исследований в этом направлении. **Целью работы** явилось проведение срав-

нительного анализа трех различных иммунохимических методов, отличающихся технологическими приемами.

Материалы и методы исследования

Научные исследования проводились при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012). Работа выполнена в лабораториях кафедры МВЭиВ-СЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» и ООО «Медицинский Центр «Академия» (г. Ульяновск) совместно с научным сотрудником А.В. Мاستиленко.

В работе были использованы референс-штаммы из коллекции музея вышеуказанной кафедры *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *Y. enterocolytica*, *Y. pseudotuberculosis*, *O. rhinotracheale*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis*, *L. acidophilus*, *S. aureus*, *B. subtilis* и 52 штамма *B. bronchiseptica*, выделенных из клинических образцов биоматериала от животных.

Схемы получения антигенов и гипериммунных сывороток были подобраны экспериментальным путем. Для получения иммунных сывороток проводили гипериммунизацию 15-ти кроликов. Получение антигенов *B. bronchiseptica* проводили с помощью ультразвукового дезинтегратора, встречный электрофорез по схеме, описанной G. Bedarida et al., реакцию иммуноэлектрофореза по методу P. Grabar и C. Williams, описанному Х. Фримель [1–4]. Иммунодиффузию для выявления особенностей антигенов посредством реакции преципитации проводили по методу O. Ouchterlony [7].

Для двойной радиальной иммунодиффузии был использован 2% агарозный гель на трис-боратном

буфере (рН-8,3). Встречный электрофорез проводили в трис-боратном буфере (рН-8,3) на 1,5% агарозном геле. Электрофорез проводили с режимом 25 В/см, 100 мА в течение 20 минут. После этого гель вынимали из электрофоретической камеры, промывали в 0,9% NaCl в течение 30 минут и наблюдали преципитаты в проходящем свете. При слабых преципитатах пластину геля оставляли в растворе 0,9% NaCl на 24–48 ч. Для проведения иммуноэлектрофореза сначала осуществляли электрофорез антигенов в агарозном геле в течение 30 минут. Толщина геля составляла 3–4 мм. Затем в канавку, параллельную миграции антигенов, наливали гипериммунную сыворотку. Для равномерной диффузии пластина с гелем находилась во влажной камере в течение 24–48 ч. Линии преципитации наблюдали в боковом освещении на темном фоне. Гели документировали и анализировали.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспериментально подобрали режим ультразвуковой дезинтеграции бактериальных клеток, позволяющий полностью разрушить бордетеллы и максимально сохранить их антигенные комплексы. Исследования по выбору оптимальной мощности и установлению амплитуды для максимального разрушения клеток ультразвуком проводили следующим образом. В стерильные пробирки типа эппендорф (на 1,5 мл) набирали по 1,0 мл культуры, с помощью зажима ставили в акустическую камеру дезинтегратора так, чтобы подающая энергию насадка была опущена в среду на 1 см, и выставляли мощность на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мк (таблица).

Опытные режимы дезинтеграции бактериальной взвеси *Bordetella bronchiseptica*

Объем бактериальной взвеси (мл)	Режимы дезинтеграции		Контроль дезинтеграции		
	Амплитуда (микрон)	Время (минут)	Разрушение клеток	Рост на МПА	Содержание белка мг/мл
1	1	1	Не полное	Рост отсутствовал	6,6
1	2	1	Не полное	Рост отсутствовал	6,6
1	3	1	Не полное	Рост отсутствовал	6,6
1	4	1	Не полное	Рост отсутствовал	6,5
1	5	1	Не полное	Рост отсутствовал	6,4
1	6	1	Не полное	Рост отсутствовал	6,3
1	7	1	Полное	Рост отсутствовал	6,2
1	8	1	Полное	Рост отсутствовал	6,0
1	9	1	Полное	Рост отсутствовал	5,9
1	10	1	Полное	Рост отсутствовал	5,6

Результаты микроскопии окрашенных по Граму бактериальных препаратов *B. bronchiseptica* до и после ультразвуковой дезинтеграции представлены на рис. 1.

Видно полное разрушение клеток после проведенной дезинтеграции.

По результатам микроскопии УЗ-антигенного препарата и проверки на полноту

инактивации высевам на мясо-пептонный агар (48 ч инкубации при 37°C).

Сохранение антигенов в дезинтегратах контролировалось электрофоретическим разделением белков в агарозном геле. В качестве контроля при электрофорезе был использован стандартный раствор сывороточного альбумина с молекулярной массой 65 кДа.

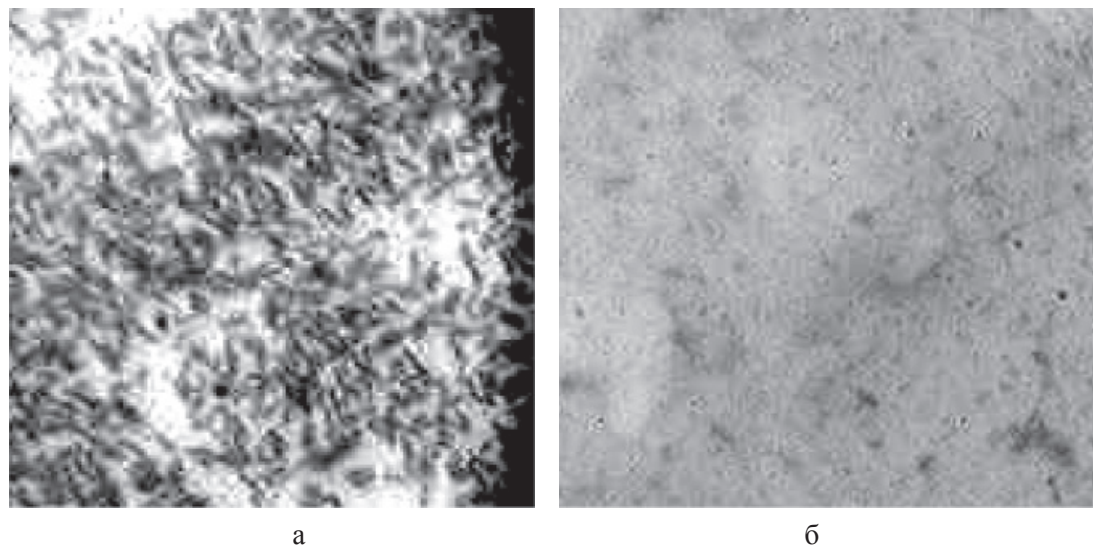


Рис. 1. Микроскопия окрашенных по Граму бактериальных препаратов *V. bronchiseptica* до (А) и после (Б) ультразвуковой дезинтеграции ($\times 1000$)

Таким образом, экспериментально был подобран следующий оптимальный режим дезинтеграции: частота 23 кГц, амплитуда колебаний 7 микрон, в течение 1 минуты на 1 мл суспензии бактериальной массы с постоянным охлаждением в смеси спирта со льдом.

Для стандартизации схемы иммунизации кроликов в дезинтеграте было определено количество белка, которое составило 6,2 мг/мл. Для удобства расчетов вводимого кроликам препарата количество белка было доведено до 5,0 мг/мл путем разведения исходного состава дезинтеграта стерильным физиологическим раствором. Для повышения иммунного ответа перед началом иммунизации кроликам внутримышечно, в область бедра вводили 0,5 мл полного

адьюванта Фрейнда. Затем каждые 3 дня внутривенно инъецировали антигенный дезинтеграт в количестве 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 и 1,5 мл. Через 10, 15, 20, 30 дней после начала иммунизации брали кровь по 5 мл от каждого кролика, готовили сыворотку и ставили объемную реакцию агглютинации. Величина титра антител составила к 10-му дню 1:80, к 15-му – 1:160, к 20 дню титр антител вырос до 1:320 и оставался на этом уровне в последующем.

Далее провели испытания иммунохимических методов: двойной радиальной иммунодиффузии, встречного электрофореза и иммуноэлектрофореза.

Результаты изучения антигенного состава бордетелл в реакции двойной радиальной иммунодиффузии представлены на рис. 2.

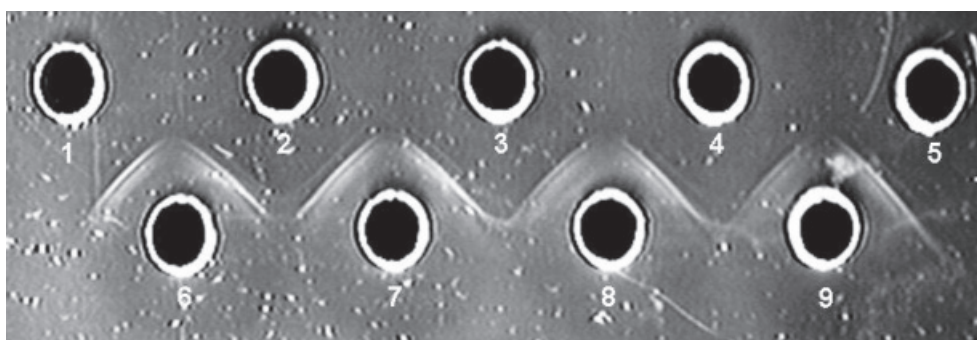


Рис. 2. Двойная радиальная иммунодиффузия.
Лунки: № 1–5 – штаммы *V. bronchiseptica*; № 6–9 – иммунная сыворотка

В результате проведенных экспериментов было получено 5 линий преципитации с комплексными антигенами различных штаммов *V. bronchiseptica* и 3 линии преципитации с комплексными антигенами *V. paraptussis*.

Таким образом, 2 антигена *V. bronchiseptica* были видоспецифичными и не давали внутривидовых перекрестных реакций.

Далее были поставлены реакции встречного электрофореза (рис. 3).

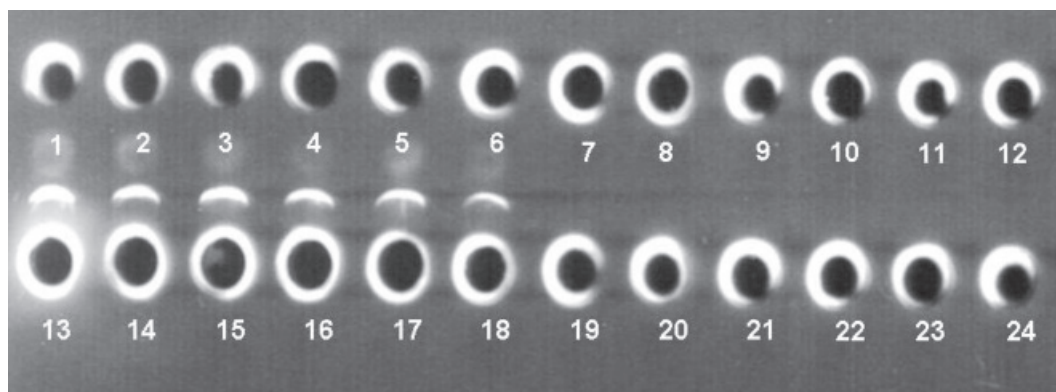


Рис. 3. Встречный электрофорез. Лунки: № 1–5 – штаммы *B. bronchiseptica*; № 6 – *B. parapertussis*; № 7 – *P. aeruginosa*; № 8 – *A. hydrophila*; № 9 – *E. coli*; № 10 – *Y. enterocolytica*; № 11 – *Y. pseudotuberculosis*; № 12 – *S. aureus*; № 13–24 – иммунная сыворотка

В результате эксперимента были получены четкие преципитаты, образованные с антигенами дезинтегрированных культур *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis*. С антигенами культур

грамотрицательных и грамположительных бактерий преципитации не наблюдалось.

Далее испытали иммуноэлектрофорез (рис. 4).

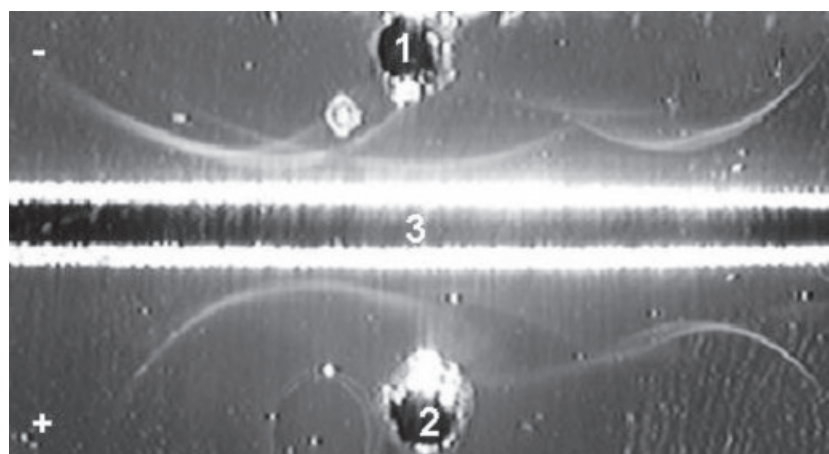


Рис. 4. Иммуноэлектрофорез. Лунки: № 1–2 – штаммы *B. bronchiseptica* 169; № 3 – гипериммунная сыворотка

В результате данного эксперимента было определено 8 антигенных комплексов *B. bronchiseptica*. Антигены различных штаммов возбудителя были идентичны по количеству и расположению линий преципитации. В опытах с комплексными антигенами *B. parapertussis* было определено 3 линии преципитации, что подтверждает наличие общих антигенов с *B. bronchiseptica*. Были проведены эксперименты иммуноэлектрофореза комплексных антигенов грамотрицательных и грамположительных бактерий с гипериммунной сывороткой. Установили, что иммунная сыворотка к антигенам *B. bronchiseptica* образует с комплексными антигенами грамотрицательных бактерий 3 линии преципитации.

Выводы

Таким образом, мы провели сравнительный анализ трех иммунохимических методов для выбора оптимальной схемы при изучении антигенного состава *B. bronchiseptica*. Установили, что иммунохимические методы являются достаточно эффективными и позволяют в короткие сроки провести анализ антигенного состава *B. bronchiseptica*.

Использование двойной радиальной иммунодиффузии позволяет обнаружить 5 антигенов *B. bronchiseptica*, 3 из которых дают перекрестную реакцию с *B. parapertussis*, 2 являются видоспецифичными. Встречный электрофорез не дает возможности провести видовую идентификацию антигенов

B. bronchiseptica. Метод иммуноэлектрофореза выявляет 8 антигенных комплексов, 5 из которых являются видоспецифичными для *B. bronchiseptica*.

В результате сравнительного анализа трех иммунохимических методов наиболее эффективным для выявления видоспецифичных антигенных детерминант является иммуноэлектрофорез.

Предлагаемая нами схема исследования антигенной структуры *B. bronchiseptica* включает выделение антигенов ультразвуковой дезинтеграцией (частота 23 кГц, амплитуда колебаний 7 микрон, в течение 1 минуты на 1 мл суспензии бактериальной массы с постоянным охлаждением в смеси спирта со льдом); получение иммунной сыворотки гипериммунизацией лабораторных животных (предварительное введение в/м 0,5 мл адьюванта Френда и в/в введение кроликам 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 и 1,5 мл антигена с интервалом 3 дней и получением крови через 20 дней с начала инъекций); проведение реакции иммуноэлектрофореза с анализом антигенных детерминант (8 белковых комплексов).

Список литературы

1. Иммунологические методы / Х. Фримель и др. - М.: Мир, 1979. - 515 с.
2. Иммунология и аллергология / А.А. Воробьев и др. - М.: Практическая медицина. - 2006. - 288 с.
3. Bedarida G. The detection of Australia antigen and anti-Au antibodies by a rapid procedure combining electrophoresis and immunoprecipitation / G. Bedarida, G. Trinchieri, A. Carbonara // *Haematologica*. - 1969. - Vol. 54. - P. 591.
4. Grabar P. *Biochim.* / P. Grabar, C. Williams // *Biophys. Acta*. - 1953. - Vol. 10. - P. 193.
5. Holby N. Cross-reactions between *B. pertussis* and twenty-eight other bacterial species / N. Holby, J.B. Hertz, V. Andersen // *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. Section B, Microbiology. - 1977. - Vol. 84. - № 6. - P. 395-400.

6. MacLennan A.P. Specific lipopolisaccharides of *Bordetella* / A.P. MacLennan // *Biochem. J.* - 1960. - Vol. 74. - P. 398-409.

7. Ouchterlony O. *Act. Pathol / O. Ouchterlony // Microbiol. Scand.* - 1948. - Vol. 25. - P. 186.

8. Ross R. Histamin-sensitizing Factor, Mouse-protective Antigens, and Other Antigens of Some Members of the Genus *B.* / R. Ross, J. Munoz, C. Cameron // *Journal of Bacteriology*. - 1969. - Vol. 99. - P. 57-44.

References

1. Immunological methods / K. Frimel M.: World, 1979. 515 p.
2. Immunology and Allergology / A.A. Vorobev M.: Practical medicine. 2006. 288 p.
3. Bedarida G. The detection of Australia antigen and anti-Au antibodies by a rapid procedure combining electrophoresis and immunoprecipitation / G. Bedarida, G. Trinchieri, A. Carbonara // *Haematologica*. 1969. Vol. 54. pp. 591.
4. Grabar P. *Biochim.* / P. Grabar, C. Williams // *Biophys. Acta*. 1953. Vol. 10. pp.193.
5. Holby N. Cross-reactions between *B. pertussis* and twenty-eight other bacterial species / N. Holby, J.B. Hertz, V. Andersen // *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. Section B, Microbiology. 1977. Vol. 84. no. 6. pp. 395-400.
6. MacLennan A.P. Specific lipopolisaccharides of *Bordetella* / A.P. MacLennan // *Biochem. J.* 1960. Vol. 74. pp. 398-409.
7. Ouchterlony, O. *Act. Pathol / O. Ouchterlony // Microbiol. Scand.* 1948. Vol. 25. pp. 186.
8. Ross, R. Histamin-sensitizing Factor, Mouse-protective Antigens, and Other Antigens of Some Members of the Genus *B.* / R. Ross, J. Munoz, C. Cameron // *Journal of Bacteriology*. 1969. Vol. 99. pp. 57-44.

Рецензенты:

Васильев Д.А., д.б.н., профессор, директор ООО «Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии», Ульяновская область, Чердаклинский р-н, пос. Октябрьский;

Нафеев А.А., д.м.н., заведующий отделением особо опасных инфекций, природно-очаговых инфекций и профилактики туберкулеза, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 01.08.2013.