

Г.М.Напалкова, И.И.Корсакова, Н.П.Храпова, Н.Н.Пивень, Л.В.Ломова, Т.В.Булатова**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ И НЕПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ РАКЕТНОГО ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Показана возможность быстрой дифференциации вирулентных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа от авирулентных и близкородственных микроорганизмов по наличию антигенного комплекса 8 с помощью ракетного иммуноэлектрофореза с сывороткой, содержащей антитела к нему.

*Ключевые слова:* сап, мелиоидоз, буркхольдерии, ракетный иммуноэлектрофорез, дифференцирование.

Существует большое число штаммов буркхольдерий, фенотипически и генотипически близких к *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, но в обычных условиях непатогенных для человека и животных. К ним относятся *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia cepacia* и филогенетически им родственная *Pseudomonas allicola* [1].

Наиболее существенная роль в проявлении патогенных и иммуногенных свойств возбудителей мелиоидоза и сапа принадлежит антигену 8 (Ag8) – поверхностному капсульному биополимеру гликопротеиновой природы с молекулярной массой около 800 kDa и его структурному компоненту 200 kDa [3, 4]. Ранее установлено, что вирулентность *B. pseudomallei* и *B. mallei* проявляется за счет антифагоцитарной активности гликопротеина, эпитопы которого были обнаружены в составе капсулы [2], поэтому представляет интерес проводить первоначальный отбор штаммов сапных и мелиоидозных бактерий от других видов буркхольдерий по наличию данного антигена. Предложенная авторами схема поиска общих, видовых и перекрестно-реагирующих антигенов указанных выше микроорганизмов включает в себя перекрестные постановки иммунологических реакций с гомологичными и гетерологичными сыворотками [2].

Способ выявления перекрестно-реагирующих антигенов возбудителей мелиоидоза, сапа, чумы, туляремии, туберкулеза и *B. thailandensis* с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия с одновременным определением их основных физико-химических характеристик был описан в 2005 г. [5]. Данный методический подход позволяет выявлять у микробных клеток индивидуальные гликопротеиновые антигены, но не дифференцировать их друг от друга, хотя авторы указывают, что антигенный спектр близкородственных видов *B. mallei* и *B. thailandensis* весьма схож с таковым у *B. pseudomallei*.

Антиген 8 также выявляли при помощи сэндвич-варианта иммуноферментного метода, используя моноклональные антитела. Авторы указывали на различия интенсивности биосинтеза антигена 8 у разных штаммов патогенных буркхольдерий двух видов. Близкородственные микроорганизмы при этом не исследовались [6].

С помощью ракетного иммуноэлектрофореза

(РИЭФ) показано, что белки мелиоидозных и сапных микроорганизмов с гомологичными сыворотками формируют пики преципитатов как в катодной (4–5 пиков), так и в анодной (8–9 пиков) области геля [5]. Однако сведения об антигенных взаимоотношениях *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* и *P. allicola* отсутствуют.

Целью работы являлась разработка быстрого способа дифференцирования патогенных возбудителей мелиоидоза и сапа от непатогенных для человека буркхольдерий и близкородственных микроорганизмов путем выявления в составе микробных клеток поверхностного комплекса (Ag8) в ракетном иммуноэлектрофорезе.

Для этого в составе микробных клеток выявляли поверхностный антигенный комплекс в РИЭФ с использованием иммунной сыворотки, содержащей антитела к данному антигену. В качестве антигенов использовали водно-солевые экстракты микробных клеток: *B. pseudomallei* 60913 (Ag8<sup>+</sup>), 51274 (Ag8<sup>+</sup>), 57576 (Ag8<sup>+</sup>), 100 (Ag8<sup>+</sup>), 100-6-1 (Ag8<sup>-</sup>), *B. mallei* B-120 (Ag8<sup>+</sup>), 10230 (Ag8<sup>+</sup>), 10230-11-2 (Ag8<sup>-</sup>), *B. thailandensis* 264, 251, 294, 295, *B. cepacia* 25416, 1234, *P. allicola* 8495.

Для постановки РИЭФ пластинку гель-бонд размером 8,5×10 см заливали 1 % агарозой фирмы «Calbiochem», приготовленной на барбитал-трис-глициновом буфере с ионной силой равной 0,016, (рН 8,8). На расстоянии 3 см от края пластинки с анодной стороны пробивали ряд лунок диаметром 4 мм. Отступив 2 мм от лунок, вырезали полоску геля шириной 2,5 см. Гель растапливали на водяной бане, охлаждали до 48 °С, добавляли к нему 0,5–2 % по объему сыворотки, содержащей антитела к антигену 8, и снова заливали на пластинку. В лунки вносили исследуемый антигенный материал.

Электрофорез проводили при ионной силе буферного раствора в электродных отсеках 0,02 и 0,032, напряженности 9 В/см в течение 4 ч и температуре 12 °С. После остановки электрофореза пластинки просматривали. Наличие пиков преципитатов в катодной области геля свидетельствовало о присутствии антигенного комплекса 8 патогенных буркхольдерий мелиоидоза и сапа.

При использовании в электродных отсеках буферного раствора с ионной силой 0,032 с помощью ракет-

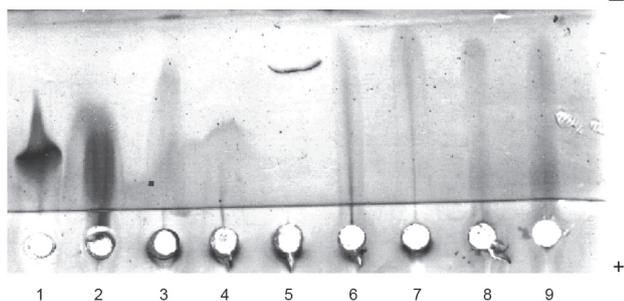


Рис. 1. Изучение патогенных и непатогенных буркхольдерий в ракетном иммуноэлектрофорезе при ионной силе буферного раствора в электродных отсеках 0,032:

1 – фракция А, содержащая антигенный комплекс 8, выделенная из *B. pseudomallei* 100 формамидом; 2 – ВСЭ *B. pseudomallei* 100; 3 – ВСЭ *P. allicola* 8495; 4 – ВСЭ *B. cepacia* 1934; 5 – ВСЭ *B. cepacia* 25416; 6 – ВСЭ *B. thailandensis* 295; 7 – ВСЭ *B. thailandensis* 294; 8 – ВСЭ *B. thailandensis* 251; 9 – ВСЭ *B. thailandensis* 264

ного иммуноэлектрофореза выявляли как патогенные, так и близкородственные буркхольдерии (рис. 1).

Применив в электродных отсеках буферный раствор с ионной силой 0,02, выявляли только вирулентные штаммы сапных и мелиоидозных микроорганизмов (рис. 2, 3).

Исследование штаммов по признаку наличия Ag8 с помощью ракетного иммуноэлектрофореза в данной модификации с антителами, полученными к антигену 8, может быть количественно использовано при изучении антигенного материала путем сравнения высоты пиков преципитатов исследуемого образца и контрольной пробы с известным содержанием Ag8 при лабораторной диагностике сапа и мелиоидоза.

Таким образом, установлено, что дифференцирование патогенных возбудителей мелиоидоза и сапа от их непатогенных вариантов и близкородственных буркхольдерий возможно с помощью ракетного иммуноэлектрофореза с сывороткой, содержащей антитела к антигенному комплексу 8.

Данный метод может применяться в комплексной диагностике сапа и мелиоидоза как дополнительный способ выявления патогенных *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

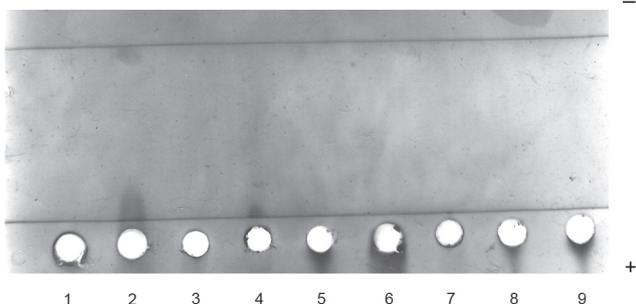


Рис. 3. Изучение патогенных и непатогенных буркхольдерий в ракетном иммуноэлектрофорезе при ионной силе буферного раствора в электродных отсеках 0,02:

1 – ВСЭ *B. cepacia* 1934; 2 – ВСЭ *B. pseudomallei* 100; 3 – ВСЭ *P. allicola* 8495; 4 – ВСЭ *B. mallei* 10230; 5 – ВСЭ *B. cepacia* 25416; 6 – ВСЭ *B. thailandensis* 295; 7 – ВСЭ *B. thailandensis* 294; 8 – ВСЭ *B. thailandensis* 251; 9 – ВСЭ *B. thailandensis* 264

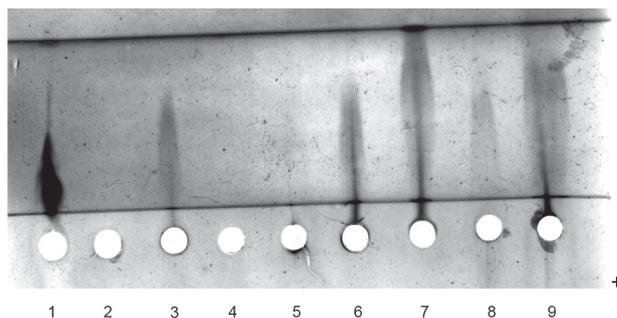


Рис. 2. Изучение патогенных и непатогенных буркхольдерий в ракетном иммуноэлектрофорезе при ионной силе буферного раствора в электродных отсеках 0,02:

1 – фракция А, содержащая антигенный комплекс 8, выделенная из *B. pseudomallei* 100 формамидом; 2 – ВСЭ *B. mallei* 10230-11-2; 3 – ВСЭ *B. mallei* 10230; 4 – ВСЭ *B. pseudomallei* 100-6-1; 5 – высушенные ацетоном клетки *B. pseudomallei* 57576; 6 – ВСЭ *B. pseudomallei* 100; 7 – ВСЭ *B. pseudomallei* 51274; 8 – высушенные ацетоном клетки *B. mallei* B-120; 9 – ВСЭ *B. pseudomallei* 60913

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сеимова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 1:7–11.
2. Пивень Н.Н. Перспективы исследования общих, перекрестно-реагирующих и видовых антигенов у некоторых видов бактерий рода *Pseudomonas*. Микробиол. журн. 1987; 3:19–24.
3. Пивень Н.Н., Алексеев В.В., Попов С.Ф., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторов Д.В. и др. Ультраструктурно-иммунохимическое изучение капсулы патогенных буркхольдерий. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 5:19–24.
4. Пивень Н.Н., Илюхин В.И. Патогенность *Burkholderia pseudomallei* как функция его внеклеточных и поверхностных антигенов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 6:94–9.
5. Пивень Н.Н., Илюхин В.И., Тимошин В.В., Викторов Д.В., Абраменко А.В. Перекрестно-реагирующие антигены патогенных буркхольдерий и некоторых опасных возбудителей инфекционных заболеваний. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 2:14–9.
6. Самыгин В.М., Храпова Н.П., Спиридонов В.А., Степин А.А. Биосинтез антигена 8 в процессе культивирования *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 4:50–2.

G.M.Napalkova, I.I.Korsakova, N.P.Khrapova, [N.N.Piven'] L.V.Lomova, T.V.Bulatova

### Differentiation of Pathogenic and Non-Pathogenic Burkholderias Using Rocket Immunoelectrophoresis

Volgograd Research Anti-Plague Institute

Demonstrated is the possibility to differentiate virulent strains of melioidosis and glanders etiological agents from avirulent ones and closely related microorganisms according to the presence of the antigenic complex 8, using rocket immunoelectrophoresis with the serum containing antibodies to this complex.

**Key words:** glanders, melioidosis, burkholderias, rocket immunoelectrophoresis, differentiation.

#### Об авторах:

Напалкова Г.М., Корсакова И.И., Храпова Н.П., Пивень Н.Н., Ломова Л.В., Булатова Т.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

#### Authors:

Napalkova G.M., Korsakova I.I., Khrapova N.P., Piven' N.N., Lomova L.V., Bulatova T.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 400131, Volgograd, Golubinskaya St., 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 16.03.10.