

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ *B. ANTRACIS* И *B. CEREUS*

Мерчина С.В., кандидат биологических наук, доцент,
sv2309@yandex.ru

Молофеева Н.И., кандидат биологических наук, доцент,
nadezhda.molofeeva.67@mail.ru

Калдыркаев А.И., кандидат биологических наук, доцент,
usxa@yandex.ru

Шестаков А.Г., кандидат биологических наук, доцент,
andrewsh@newmail.ru

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: антигенная структура, преципитирующие сыворотки, противосибиреязвенные сыворотки, бактериальные клетки, питательные среды.

*Описаны результаты изучения антигенной структуры *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* различными методами и активность комплекса антиген-антитело.*

Введение. Иммунологические методы позволяют эффективно выявлять специфические антигены в присутствии большого количества неродственных белков.

Широкое применение при изучении антигенной структуры бактерий, в частности, *Bacillus anthracis*, и определении серологического родства с представлениями близкородственных видов нашла реакция диффузионной преципитации (РДП). РДП является одним из специфических методов иммуно-химического анализа сложных антигенных комплексов, позволяя выявлять наличие как отдельных антигенов, так и родственных антигенных структур.

РДП в геле неоднократно применялась для

дифференциации возбудителя сибирской язвы от близкородственных бактерий [1].

Материалы и методы исследования. Для оценки общности сибиреязвенных антигенов и антигенов, выделенных из штаммов *Bacillus cereus*, использовали коммерческие сыворотки: преципитирующей и противосибиреязвенной, а также с сибиреязвенный глобулин [2].

Результаты исследований и их обсуждение. РДП ставили по методу двойной диффузии в агаровом геле по Оухтерлони в чашках Петри. Основные закономерности этой реакции заключаются в следующем:

- один антиген даёт одну полосу преципитации;
- если в реакции присутствует несколько антигенов, они реагируют независимо друг от друга;
- количество присутствующих зон преципитации соответствует минимуму присутствующих в системе комплексов антиген-антитело.

Первоначально необходимо было определить способ наиболее эффективного выделения антигенного комплекса для использования этого метода в проведении наших дальнейших исследований. В связи с этим апробированы различные способы извлечения антигенов из вегетативных клеток *Bacillus anthracis* культивируемых в жидкой среде. По нашим данным, выход бактериальной массы на ней был значительно больше, чем на МПБ.

Далее необходимо было получить антигенные препараты. Для этого использовали две методики:

- разрушением SDS;
- прогреванием при 100°C в водяной бане в течение 20 минут [3,4].

По первой методике отмытые в 0,5 л питательной среды трехкратным центрифугированием 5000 об/мин - 30 минут в физиологическом растворе бактериальные клетки соединяли с додецилсульфатом натрия (808) в конечной концентрации 0,5% раствора и выдерживали в термостате 18 часов. Полученный субстрат центрифугировали при 7000 g. Осадок являлся антигеном, и его разводили в 5 мл физраствора. Для остаточной инактивации культуры добавляли раствор мертиолята в концентрации 0,001%. Контроль стерильности проводили высевом на МПА. В результате получен антиген штамма *Bacillus cereus* № 8035, обработанный SDS, стерильный, первоначальной концентрации 0,5 млрд./мл, возможный для использования в РДП. Таким же способом получен антиген штамма СТИ *Bacillus anthracis*.

По второй методике - на питательную среду 0,5 л вводили культуру штамма *Bacillus anthracis* СТИ, затем культивировали 18 часов при температуре 37°C. Полученную бактериальную массу трехкратно центрифугировали при 5000 об/мин 20 минут и трехкратно рессуспензировали в физрастворе. Концентрацию бактериальной массы доводили по стандарту мутности до величины 5,0 млрд./мл. Суспензию бактерий подвергали термической обработке на водяной бане при 100°C 20 минут. Контроль стерильности проводили высевом на МПА. В результате получен антиген, обработанный температурой 100°C, стерильный, концентрации первоначальной 5,0 млрд./мл, возможный для использования в РДП [5,6].

Для постановки этой реакции растопленный гель наливали на предметные стекла и после затвердения вырезали отверстия диаметром до 5 мм. В противолежащие лунки раздельно помещали антигены и сыворотки. После

заливки компонентов РДП предметные стекла помещали во влажную камеру для предотвращения высыхания агара. В качестве влажной камеры использовали эксикатор, в которую положена намоченная водой фильтровальная бумага. Специфические антигены и антитела диффундируют из мест локализации навстречу друг другу и, взаимодействуя образуют преципитат, которая выглядит как непрозрачная белая полоса. В реакции диффузионной преципитации из-за различной скорости диффузии строго соответствующих пар антиген-антитело линии образуются в соответствии с молекулярными массами и количествами исследуемых антигенов. Предварительный учет результатов реакции иммунодиффузии проводили через 8 часов, окончательный через 48 часов [7,8].

Выводы. В результате проведенных исследований установлено, что наиболее активным оказался антигенный комплекс, выделенный из клеток *Bacillus anthracis* с помощью SDS разрушения. С преципитирующей сывороткой этот комплекс образовывал 4 линии преципитации, с противосибириязвенной - 3, с глобулином - 6.

Антиген, полученный из клеток *Bacillus anthracis* кипячением, образовывал 1 линию преципитации с преципитирующей сывороткой и не реагировал с глобулином и противосибириязвенной сывороткой.

В результате установлено, что штамм *Bacillus cereus* содержит комплексы, родственные антигенам возбудителя сибирской язвы.

Библиографический список:

1. Феоктистова Н.А. Выделение и идентификация бактерий *Bacillus cereus* /Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. и

др.//Естественные и технические науки. - 2018. - № 7 (121). - С. 28-33.

2. Мерчина С.В. Изучение антигенной структуры *B. antracis* и *B.cereus*/ С.В. Мерчина, В.А. Русалеев, Т.А. Елантьева// Сб. «Материалы Всероссийской научно-производственной конференции "Инновационные технологии в аграрном образовании, науке и АПК России" 60-летию академии посвящается». УГСХА, 2003.- С.249-250.

3. Мерчина С.В. Изучение действия соли нитрита натрия на рост *B.cereus*/ С.В. Мерчина, В.А. Русалеев и др.// УГСХА, 2002. № 8.- С.11-12.

4. Мерчина С.В. Классификация и таксономия двух видов- *Vac.anthraxis* и *Vac.cereus*// С.В. Мерчина, В.А. Русалеев, Д.А Васильев// УГСХА, 2002. № 8.- С.12-15.

5. Мерчина С.В. Выбор оптимального метода вегетации спор бактерии *B.cereus*/ С.В. Мерчина, В.А. Русалеев и др.// УГСХА, 2002. № 8.- С.7-9.

6. Золотухин С.Н. Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтерогемморагической кишечной палочки *E. coli O157:H7* и *O157:H-в* патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов // С.Н. Золотухин, Н.И. Молофеева и др.//Научное издание .- Москва. - 2005. – 23с.

7. Феоктистова Н.А. Биотехнологические параметры конструирования биопрепарата на основе фагов для индикации и идентификации *Bacillus pumilus* в пищевом сырье и продуктах питания Н.А. Феоктистова, Н.И.Молофеева и др.//Современные проблемы науки и образования. - 2016. - № 6. - С. 518.

8. Мерчина С.В. Изучение сроков жизнеспособности *B.cereus* в пищевых добавках (специи), используемых при

производстве колбас/ С.В. Мерчина, В.А. Русалеев и др.// УГСХА, 2002. № 8.- С.10-11.

METHODS FOR DETECTING THE ANTIGENIC STRUCTURE OF B. ANTRACIS AND B. CEREUS

**Merchina S. V., Molofeeva N. I., Kaldyrkaev A. I.,
Shestakov A. G.**

Keywords: antigen structure, precipitating sera, anti-ulcer sera, bacterial cells, culture media.

The results of studying the antigenic structure of Bacillus antracis and Bacillus cereus by various methods and the activity of the antigen-antibody complex are described