

УДК 619:616.98:579

## ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ АНТИСПОРОВЫХ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ СЫВОРОТОК EVALUATION OF ANTISPORE ANTHRAX SERA FOR SPECIFICITY

*И.В. Лягоскин, В.Н. Пономарев, Ю.О. Селянинов*

*I.V. Lyagoskin, V. N. Ponomarev, Y.O. Selyaninov*

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт  
ветеринарной вирусологии и микробиологии, РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ,  
г. Покров, Владимирской области, Россия*

*State Research Institute National Research Institute for Veterinary  
Virology and Microbiology of Russia, Russian Academy for  
Agricultural Science, Pokrov, Vladimir Region, Russia*

*The report is focused on investigations into specificity levels of a number of obtained antispore anthrax sera using various methods like ELISA, DPT or immunoelectron microscopy.*

Разработка средств специфического обнаружения возбудителя сибирской язвы в объектах окружающей среды до настоящего времени является актуальной проблемой. В качестве одного из компонентов разрабатываемых для этих целей иммунохимических методов применяют иммунные сыворотки, для получения которых используют животных разных видов. При этом следует учитывать, что иммунореактивность различных животных и состав их иммуноглобулинов неодинаковы. Кролики, например, при иммунизации отвечают образованием преципитирующих антител на наибольшее число представляемых антигенов, а гипериммунные сыворотки лошадей и коз, как правило, выявляют меньший спектр антигенов, но при этом могут обладать более высокой специфичностью [3]. В то же время ряд исследователей отмечает, что иммунные сыворотки кроликов дают меньше перекрёстных реакций, чем сыворотки лошади.

В данное время иммунохимические реакции при индикации *B. anthracis* в объектах окружающей среды, особенно в почве, практически не применяются. В значительной степени это обусловлено отсутствием высокоспецифичных сывороток или иммуноглобулинов, так как споры представителей рода *Bacillus* обладают слабой иммуногенностью и наличием большого числа общих для спорообразующих сапрофитов антигенных детерминант.

Целью данной работы являлась оценка специфичности гипериммунной козьей сыворотки, полученной к антигенным детерминантам спор *B. anthracis*.

**Материалы и методы.** В работе использовали споры *B. anthracis* (штаммы 55-ВНИИВВиМ, М71, Sterne), а также споры близкородственных сапрофитов - *B. cereus* (штаммы №96 и Дакар 1), *B. subtilis* (штамм 830), *B. mesentericus* (штамм 66), *B. pumillis* (штамм NRS).

Для получения гипериммунных антиспоровых сывороток коз иммунизировали путем чередующихся подкожных и внутривенных инъекций споровых термоантигенов *B. anthracis* штамма 55-ВНИИВВиМ. Антигены получали путём

автоклавирования суспензии спор с концентрацией  $10^9$  спор/мл при 1 атм в течение 30 минут.

При определении уровня антител, индуцируемых споровыми термоантигенами, использовали следующие методы: общий пул антител изучали в непрямом варианте ТФ ИФА, агглютинирующих антител - в РНГА с использованием сибирезвонного эритроцитарного диагностикума, изготовленного на основе цитоплазматического антигена, преципитирующих антител – в реакции диффузионной преципитации (РДП) по Оухтерлони.

Мечение антител коллоидным золотом проводили по методике Л. А. Дыкмана [1].

Коньюгаты антител с пероксидазой хрена готовили по методу Tijssen P. [4].

**Результаты.** Сравнительное изучение взаимодействия споровых антигенов исследуемых штаммов *B. anthracis* и штаммов близкородственных сапрофитов с антителами гипериммунных сывороток коз в непрямом варианте ТФ ИФА показало следующее. Титры антител, выявляемые в сыворотках крови при взаимодействии с гомологичным антигеном, были выше, чем с гетерологичными, но при этом среди споровых антигенов исследованных штаммов наблюдался высокий уровень перекрестной реактивности (Табл. №1).

При исследовании сывороток крови козы в РНГА с сибирезвонным эритроцитарным диагностикумом титр агглютинирующих антител составил 1:1280.

В РДП линии преципитации с гомологичным антигеном формировались в разведениях до 1:128, а с гетерологичным антигеном – до 1:8 (термоантиген из штамма Дакар1). Термоантигены *B. cereus* штамм 96 не формировали полос преципитации с антителами испытуемой сыворотки.

**Таблица 1. Перекрестная реактивность антител антиспоровой сыворотки крови козы n=3**

| Споровый антиген | Титры антител     |       |
|------------------|-------------------|-------|
|                  | ТФ ИФА            | РДП   |
| Шт. 55-ВНИИВВиМ  | 1:12800 – 1:25600 | 1:128 |
| Шт. Дакар 1      | 1:3200 - 1:6400   | 1:8   |
| Шт. 96           | 1:3200 – 1:6400   | -     |

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что гипериммунная сыворотка козы содержит антитела к спорам *B. anthracis* в более высоких титрах, чем антитела к спорам *B. cereus*, причём это соотношение антител относится как к агглютиниnam, так и к преципитинам.

На следующем этапе работ для повышения специфической активности сыворотки козы и уменьшения перекрёстных реакций, было проведено удаление антител к общим для спор рода *Bacillus* антигенным детерминантам. Для этого сыворотку истощали по методу, предложенному Р. Хофманом с соавтор. (1979) с нашими модификациями (3).

После истощения сыворотки термоантигеном из штамма Дакар 1 титр антител с гомологичным антигеном составил 1:6400, а с гетерологичными -

1:200-1:400. Титры антител в сыворотке крови, истощённой термоантигеном *B.cereus* штамм №96, составляли 1:6400 и 1:1600-1:3200 соответственно.

Поскольку сыворотка козы, истощенная термоантигеном *B.cereus* штамм Дакар1 обладала более высокой специфичностью, она была использована для дальнейших исследований.

Специфическую связь антител с поверхностными антигенами сибиреязвенных спор изучали иммуноэлектронной микроскопией. Антитела выявляли с помощью белка А, меченного коллоидным золотом. Результаты взаимодействия специфических антител со спорами сибиреязвенного микроба и близкородственных сапрофитов представлены на микрофотографиях (Рис. 1).

Взаимодействие сывороточных антител с антигенными детерминантами спор возбудителя сибиреязвенного микроба (рис 1) проявлялось в виде их прикрепления на значительной части споровой поверхности – большое число «темных точек» на поверхности споры штамма 55-ВНИИВВиМ (Рис. 1А). На поверхности спор *B.cereus* штамм Дакар1 наблюдалось прикрепление единичных антител (Рис. 1Б), а спор *B.cereus* штамм №96 (Рис 1В) – прикрепление антител отсутствовало.

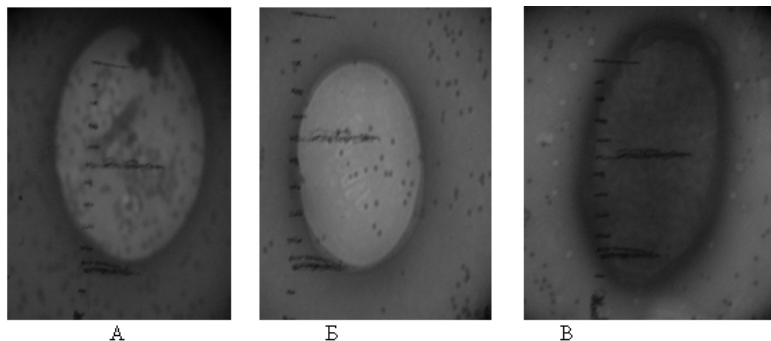


Рис1. Иммуноэлектронная микроскопия взаимодействия противосибиреязвенных антиспоровых антител сыворотки козы с антигенными детерминантами спор различных штаммов (негативное контрастирование, увеличение  $\times 100000$ ): А) *B.anthraxis* 55- ВНИИВВиМ; Б) *B.cereus* Дакар1; В) *B.cereus* №96

Примечание: темные точки – антитела, выявляемые белком А, меченым коллоидным золотом

С целью определения возможности применения прямого варианта ТФ ИФА для дифференциации спор *B. anthracis* на основе иммуноглобулинов козы был приготовлен пероксидазный конъюгат.

При оценке специфичности изготовленных иммунореагентов использовали споры следующих штаммов: *B.anthraxis* - 55-ВНИИВВиМ, М71, Sterne; *B.cereus* - №96 и Дакар 1; *B.subtilis* 830; *B.mesentericus* 66; *B.pumillis* NRS.

Анализ результатов испытаний показал, что изготовленный конъюгат специфически взаимодействовал со спорами всех сибиреязвенных штаммов (55-ВНИИВВиМ, М71, Sterne) и в меньшей степени спорами *B.cereus* штамма Дакар 1. Взаимодействие конъюгата со спорами штамма №96 *B.cereus*, 830 *B.subtilis*, 66 *B.mesentericus*, NRS *B.pumillis* отсутствовало.

Таким образом, на козах нами была получена гипериммунная сыворотка, содержащая антитела к спорам *B. anthracis*, специфически взаимодействующие с антигенными детерминантами данного патогена и не взаимодействующие с антигенами спор типичного представителя *B. cereus*. Методами непрямого и прямого вариантов ТФ ИФА, РДП и иммуноэлектронной микроскопии подтверждено присутствие на поверхности спор *B. cereus* штамма Дакар 1 некоторого числа антигенных детерминант, сходных с таковыми спор *B. anthracis*. По-видимому, с наличием этих детерминант связано получение ложно-положительных результатов при проведении диагностических исследований [2]. Считаем целесообразным проведение дальнейших исследований по изучению структуры подобных детерминант и получению моноклональных антител, строго специфичных к антигенам спор сибиреязвенного микроба, что позволит разработать высоко-специфические диагностические тест-системы для идентификации спор возбудителя сибирской язвы, основанные на методах иммунохимии.

#### Литература:

1. Дыкман Л.А. Развитие методологии иммуноанализа почвенных ассоциативных бактерий с использованием препаратов коллоидного золота: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1996. – 24 с.
2. Егорова И.Ю., Селянинов Ю.О., Лягоскин И.В. Сравнительная характеристика почвенных изолятов группы *Bacillus cereus* // Ветеринария. - 2008 г. - №6. - С. 29-33
3. Иммунологические методы. // Под ред. Г. Фримеля, Пер. с нем. А.Н. Маца. – М.: «Мир», 1979, 520 с.: ил.
4. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 15 / Ed. by Burdon R.H., Knippenberg P.H. – Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier, 1985.

УДК 619:579

### ХАРАКТЕРИСТИКА ФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА KLEBSIELLA И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НА ИХ ОСНОВЕ БИОПРЕПАРАТА THE CHARACTERISTICS OF PHAGES OF BACTERIA OF STEM KLEBSIELLA AND WORKING OUT OF PARAMETERS OF PRACTICAL APPLICATION FOR CREATION ON THEIR BASIS OF THE BIOLOGICAL PRODUCT

*Ляшенко Е.А., Золотухин С.Н., Васильев Д.А.*  
*Ljashenko E.A., Zolotukhin S.N., Vasiljev D.A.*  
*Научно-исследовательский инновационный центр*  
*микробиологии и биотехнологии, УГСА*

*The Research innovative centre of microbiology and biotechnology,*  
*The Ulyanovsk state agricultural academy*

*In the article there is given information about the isolated and selected bac-*