

УДК: 619:616.98:579.852.11:616-078

**ВЫЯВЛЕНИЕ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ  
СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА  
DETECTION OF SPECIES-SPECIFIC  
ANTIGENS OF ANTHRAX MICROBE**

**Лягоскин И.В., Васина Н.К.,  
Селянинов Ю.О.  
Lyagoskin I.V., Vasina N.K.  
Selyaninov Yu.O.**

**ГНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии.  
SRI National Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology**

*This report is devoted to the study of antigen composition of spores belonging to some B.cereus group members. In the course of the investigations we determined presence of specific polypeptide with molecular weight 19 kDa in the anthrax agent the was absent in some closely-related saprophytes.*

Ни один из применяемых в настоящее время идентификационных методов, основанных на выявлении специфических сибиреязвенных антител, клеточных или споровых антигенов не имеет 100 % специфичности, ввиду высокого уровня антигенного сходства у микроорганизмов группы *B. cereus* [1,2]. Это, а также ряд других обстоятельств, может приводить к затруднениям при установлении видовой принадлежности изолятов *B. anthracis*, особенно с атипичными свойствами. По некоторым литературным данным рядом авторов выявлены высокоспецифичные сибиреязвенные антигены [2]. В большей степени это касается соматических антигенов вегетативной формы *B. anthracis* и в меньшей – споровой. Так, А.К. Галиуллин [3] в спорах выявлена фракция, содержащая полипептид с молекулярной массой 90 кДа, обладающий высоким аффинитетом к возбудителю сибирской язвы и отсутствующий у спор *B. cereus*.

Барановой Е.В. с соавт. [1] удалось выделить высокоиммуногенный антиген из спор вакцинного штамма СТИ *B. anthracis*. Иммуноцитохимические и иммунохимические исследования, включая электронную микроскопию и Western-блот, показали, что данный антиген с молекулярной массой 94 кДа локализуется на внешней оболочке спор.

Однако, в своих экспериментах, по оценке специфичности выделяемых сибиреязвенных антигенов, авторы, как правило, используют референс-штаммы, обладающие наиболее характерными видовыми характеристиками и не применяют близкородственные в антигенном отношении штаммы сапрофитов, что может приводить к получению необъективных результатов.

В коллекции штаммов ГНУ ВНИИВВиМ имеются культуры сапрофитов группы *B. cereus*, обладающие как характерными видовыми антигенными свойствами (№96), так и высоким уровнем антигенного сходства с представителями вида *B. anthracis* (№ 63, 313, Дакар 1 - положительная реакция термопреципитации по Асколи и РДП с преципитирующей сибиреязвенной сывороткой). В связи с тем, что ранее антигенный состав спор таких штаммов

не исследовался, целью данной работы явилось выявление их антигенных различий.

**Материалы и методы.** В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов из коллекции ГНУ ВНИИВВиМ: *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, Sterne, M71, *B. cereus* № № 63, 96, 313 и Дакар 1.

При получении специфических антиспоровых сывороток использовали схему гипериммунизации кроликов и коз, предложенную Н.П. Буравцевой (1978).

Гипериммунную антиспоровую сыворотку, полученную на антигенные детерминанты спор штамма 55-ВНИИВВиМ, адсорбировали антигенами *B. cereus* штамма Дакар1 и №96 по методу Р. Хофмана с соавтор. (1979) с модификациями.

Поверхностные полипептиды спор исследуемых штаммов выделяли термоэкстракцией (10 мин при 99 °С) с использованием буфера, содержащего 4 % додецилсульфата натрия (SDS). Разделение белков осуществляли электрофорезом в 10%-ном SDS-полиакриламидном геле по Laemmli et al. [5] с последующим окрашиванием в растворе кумасси ярко-синий R-250.

Иммуноблоттинг проводился по методу Tombin P.K. et al [6]. Молекулярные массы полипептидов рассчитывали, используя компьютерную программу «Molmas.bas».

**Результаты.** Для выявления различий в антигенных профилях изучаемых штаммов/изолятов проводили электрофоретическое разделение полипептидов спор в 10% ПААГ- SDS с последующим иммуноблоттингом.

Анализ электрофореграмм показал, что полипептидные профили спор исследуемых штаммов имеют значительное сходство, причем в наибольшей степени это сходство отмечалось между штаммами 55-ВНИИВВиМ и Дакар 1. В основном различия проявлялись в интенсивности окраски некоторых фракций. Молекулярная масса полипептидов колебалась от 10 до 120 кДа, а количество фракций варьировало от 20 до 25 в зависимости от штамма (рис. 1).

Интересен факт наличия в полипептидных профилях штаммов 55-ВНИИВВиМ и Дакар 1 полипептида с молекулярной массой 91 кДа, отсутствующего у *B. cereus* штамм №96. У штамма 55-ВНИИВВиМ этот полипептид присутствовал в виде мажорного белка, а у Дакар 1 - в виде минорного. Возможно, этот белок относится к белкам S-слоя (Farchaus J. et al., 1995), который по данным ряда авторов является специфичным для сибиреязвенного микроба [1,3].

Выявление специфических антигенов проводили методом иммуноблоттинга.

При определении специфичности белков *B. anthracis* штамм 55-ВНИИВВиМ методом иммуноблоттинга с использованием кроличьих антиспоровых сывороток установлено, что в экстракте спор штамма 55-ВНИИВВиМ гомологичной сывороткой выявляется до 23 антигенов, а сыворотками, полученными на *B. cereus* штамм Дакар 1 и №96 - 16 и 9 антигенов соответственно (рис. 2). Причем белок с молекулярной массой 91 кДа, выявлялся как гомологичной сывороткой, так и сывороткой, полученной на споровые антигены штамма Дакар 1. Антитела гипериммунной сыворотки, полученной на *B. cereus* штамм №96, в большей степени взаимодействовали с полипептидами небольшой молекулярной массы (10-40 к.Да) и не взаимодействовали с

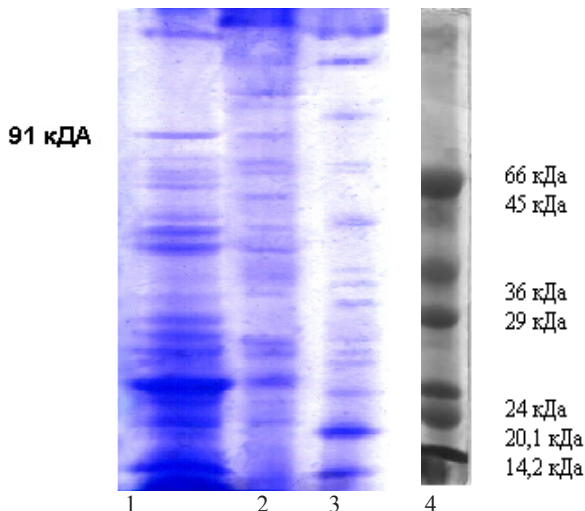


Рис. 1.-Электрофореграмма полипептидов спор исследуемых штаммов.

Примечание: 1 – SDS-лизат спор *B.anthraxis* 55–ВНИИВВиМ; 2 - SDS-лизат спор *B.cereus* Дакар 1; 3 - SDS-лизат спор *B.cereus* №96; 4 - Маркерные белки.

полипептидом 91 к.Да.

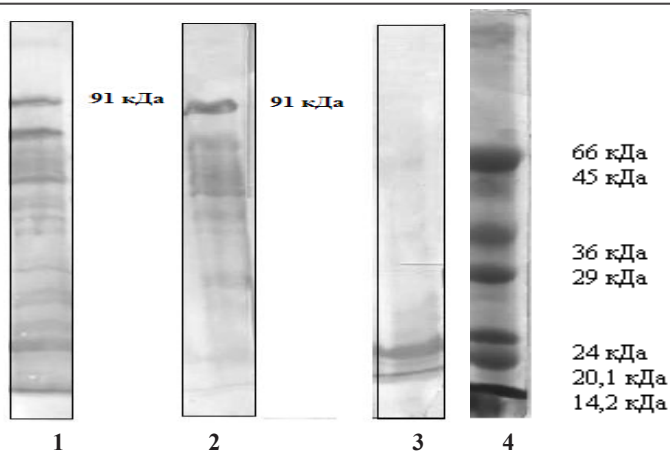
Сходная картина наблюдалась и при взаимодействии антигенов спор штамма Дакар 1 с антителами гомологичной и гетерологичных антиспоровых сывороток. Наибольшая перекрёстная реактивность антигенов Дакар 1 проявлялась с антиспоровой сывороткой на штамм 55-ВНИИВВиМ.

Учитывая, что с помощью антител сывороток крови кролика не удалось выявить специфические сибиреязвенные антигены, была проведена иммунизация коз. Известно, что кролики отвечают образованием преципитирующих антител на наибольшее число представляемых антигенов. В отличие от них, гипериммунные сыворотки крови лошадей и коз, как правило, выявляют меньший спектр антигенов, и поэтому могут обладать более высокой специфичностью.

Для получения антиспоровых сибиреязвенных сывороток, коз иммунизировали термоантигенами спор *B.anthraxis* 55-ВНИИВВиМ.

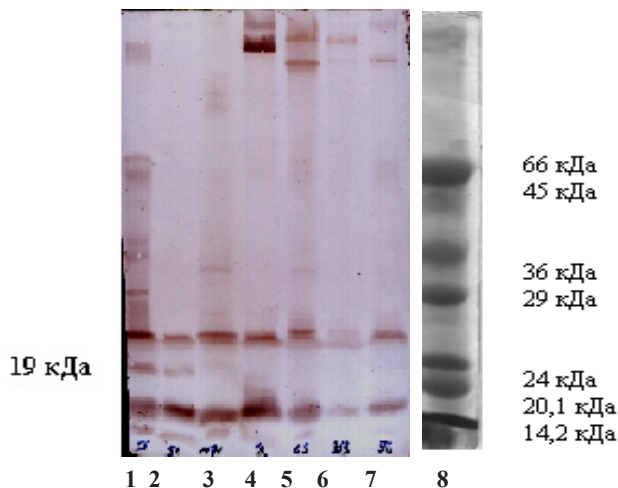
Специфичность полученных иммуноглобулинов была проверена методом иммуноблоттинга с растворимыми SDS-экстрактами, из спор сибиреязвенных штаммов (55-ВНИИВВиМ, Sterne, M71) и штаммов близкородственных сапрофитов (№№63, 96, 313 и Дакар1).

На рисунке 3 видно, что сыворотка крови козы более специфична, чем сыворотка крови кролика. Так, антитела сыворотки крови козы взаимодействуют с 15 антигенами штамма 55-ВНИИВВиМ и 6 антигенами у штамма Дакар1 и №96. Кроме того, в профилях всех сибиреязвенных штаммов (55-ВНИИВВиМ, Sterne, M71) выявляется антиген, электрофоретическая масса которого, составляет около 19 кДа. Данный антиген не выявляется ни у одного из



**Рис.2. - Иммуноблоттинг SDS-экстракта спор *B.anthraxis* штамм 55 – ВНИИВВиМ с антиспоровыми гипериммунными сыворотками крови кроликов.**

Примечание: 1 – антиспоровая сыворотка на *B.anthraxis* штамм 55-ВНИИВВиМ; 2 - антиспоровая сыворотка на *B. cereus* штамм Дакар 1; 3 - антиспоровая сыворотка на *B. cereus* штамм №96; 4 – Маркерные белки.



**Рис.3.- Иммуноблоттинг SDS-экстракта спор исследуемых штаммов с антиспоровой сывороткой крови козы.**

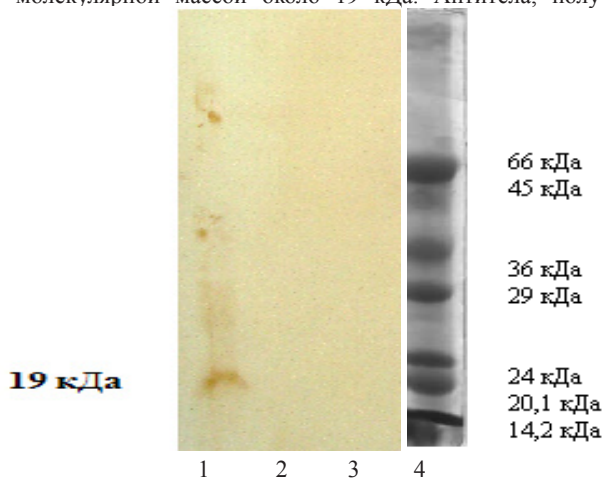
Примечание: 1 – *B.anthraxis* штамм 55-ВНИИВВиМ; 2 - *B.anthraxis* штамм Sterne; 3 - *B.anthraxis* штамм М71; 4 - *B. cereus* штамм Дакар 1; 5 - *B. cereus* штамм №63; 6 - *B. cereus* штамм №313; 7 - *B. cereus* штамм №96; 8 – Маркерные белки.

сапрофитных микроорганизмов, используемых в опыте (рис. 3).

Сыворотки крови коз были освобождены от общих для группы *B. cereus* антител, истощением термоантигенами, изготовленными из спор *B. cereus* № 96 и Дакар 1. При использовании в иммуноблоттинге нативной сыворотки козы и истощенной термоантигеном из *B. cereus* штамма №96, существенных различий в иммуноблоттограммах не было выявлено.

Антитела истощенной термоантигеном из *B. cereus* штамма Дакар 1 сыворотки крови козы, взаимодействовали только с антигеном сибиреязвенного микроба с молекулярной массой около 19 кДа (рис. 4).

Таким образом, в профилях спор сибиреязвенного микроба, с помощью освобожденных от общих для группы *B. cereus* антител выявляется антиген с молекулярной массой около 19 кДа. Антитела, полученные на данный



**Рис. 4.- Иммуноблоттинг SDS-экстрактов спор исследуемых штаммов с иммуноглобулинами противосибиреязвенной антиспоровой сыворотки козы.**

Примечание: 1 – SDS – экстракт спор *B. anthracis* штамм 55-ВНИИВВиМ; 2 – SDS– экстракт спор *B. cereus* штамм Дакар 1; 3 – SDS– экстракт спор *B. cereus* штамм №96; 4 – Маркерные белки

видоспецифический антиген, могут быть использованы для усовершенствования имеющихся методов выявления и идентификации спор сибиреязвенного микроба.

#### Литература:

1. Баранова Е.В., Рудницкий С.Ю., Колосова Н.В., Бызова Н.А., Бикетов С.Ф., Дятлов И.А. Разработка иммунохроматографической тест-системы на основе высокоспецифичной пары антител для обнаружения спор *Bacillus anthracis*. // Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах – участниках СНГ. - Саратов 2007. – с. 166 – 168.

2. Васильев, П.Г., Антигенная структура штаммов *B. anthracis*, выделенных

из различных источников внешней среды /П.Г. Васильев [и др.]. // Матер. юбил. научн. конф., посвящ. 50-ти-летию Центра ВТП биологической защиты НИИ микробиологии МО РФ. – Екатеринбург, 1999.- С. 32-33.

3. Диагностическое значение субъединичного сибиреязвенного антигена /А.К. Галиуллин [и др.]. // Ветеринария. - 1996. - №1. - С. 17-19.

4. Лопаткин О.Н., Фунтикова Т.Н., Кронгауз И.В., Матюшенко В.С. Изучение уровня антигенного родства возбудителей сибирской язвы и различных штаммов *B. cereus*. // Тез докл. краевой науч. конф., посвящ. образованию СССР. – Ставрополь. – 1982. с. 175 – 178.

5. Laemmli V.K. Cleavage of structural protection during the assemble of the bacteriophage T4. // Nature (London). – 1970. – V.27. – P. 680 – 685.

6. Tombin P.K., Staehelin T., Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gel to nitrocellulose sheets. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. – Vol. 76. №9. – P. 4350 – 4354.

## ИЗУЧЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ В ПОЛИВАЛЕНТНОМ ПРЕПАРАТЕ STUDY OF THE LYTIC ACTIVITY OF THE PHAGES OF ENTEROBACTERIACEA IN THE POLYVALENT PREPARATION

**Мелехин А.С., Золотухин С.Н., Васильев Д.А.**  
**Melekhin A.S., Zolotukhin S.N., Vasiliev D.A.**  
**Ульяновская ГСХА**

*In the article there is given information about the interference of 13 strains of the Enterobacteriaceae phages used to construct the polyvalent preparation. The antagonistic effect is absent.*

Желудочно-кишечные заболевания поросят-сосунов распространены повсеместно и наносят огромный экономический ущерб свиноводческим хозяйствам, особенно специализированным промышленным комплексам.

К настоящему времени накоплен огромный фактический материал, свидетельствующий о том, что в преобладающем большинстве случаев желудочно-кишечные заболевания новорожденных животных имеют инфекционную природу и обусловлены разнообразными агентами. Особое место в этиологии заболеваний новорожденных животных занимает так называемая «стойловая» условно-патогенная микрофлора, которая в отличие от возбудителей «классических инфекций» ежедневно поступает с экскрементами клинически здорового маточного поголовья (животных-бактерионосителей), а при возникновении первых случаев болезни - с фекалиями больного молодняка в репродукторные помещения, где рождаются животные и проводится их выращивание в первые недели жизни.

К такой микрофлоре, наряду с некоторыми другими микроорганизмами,