

И.И.Корсакова, Н.П.Храпова, Г.М.Напалкова, Л.В.Ломова, Т.В.Булатова

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УСКОРЕННОГО ЛИНЕЙНОГО ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ БУРКХОЛЬДЕРИЙ

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград,
Российская Федерация

Целью работы являлась разработка способа ускоренного линейного иммуноэлектрофореза для дифференцирования патогенных возбудителей сапа и мелиоидоза от непатогенных близкородственных буркхольдерий. Предлагаемая модификация метода позволила обнаружить антигены патогенных *B. pseudomallei* и *B. mallei* по наличию линий преципитата на границе геля-образца и геля с иммунными сыворотками. *B. thailandensis*, *B. cepacia* и *B. gladioli* таких линий преципитата не образовали, что дало возможность дифференцировать их от патогенных буркхольдерий. Способ ускоренного ЛИЭФ отличается простотой, быстротой исполнения, наглядностью. Метод пригоден для определения общих и специфических антигенов буркхольдерий, отбора иммунных сывороток, содержащих антитела к соответствующим антигенам, и может применяться как дополнительный аналитический метод выявления антигенов патогенных буркхольдерий.

Ключевые слова: сап, мелиоидоз, патогенные и непатогенные буркхольдерии, дифференциация, ускоренный линейный иммуноэлектрофорез.

I.I.Korsakova, N.P.Khrapova, G.M.Napalkova, L.V.Lomova, T.V.Bulatova

Application of the Rapid Linear Immune-Electrophoresis for Differentiation between *Burkholderia*

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Objective of the study was to develop a method that would allow for rapid linear immune-electrophoresis to differentiate between pathogenic agents of glanders and melioidosis and non-pathogenic closely-related *Burkholderia*. The put-forward modification of the technique made it possible to detect the antigens of pathogenic *B. pseudomallei* and *B. mallei* due to the presence of precipitation lines in between the sample gel and the one with immune sera. *B. thailandensis*, *B. cepacia*, and *B. gladioli* did not form such precipitation lines, which in its turn provided for the possibility to differentiate between the mentioned ones and pathogenic *Burkholderia*. The rapid enhanced linear immune-electrophoresis is easy to perform and compelling, and takes little time. It is qualified for identification of heterogenic and specific antigens in *Burkholderia*, selection of immune sera containing antibodies to the existing antigens, and can be used as a supportive alternative analytical means for the detection of antigens of pathogenic *Burkholderia*.

Key words: glanders, melioidosis, pathogenic and non-pathogenic *Burkholderia*, differentiation, rapid linear immune-electrophoresis.

Кластер из трех близкородственных микроорганизмов, характеризующихся высокой схожестью, включает *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* и *Burkholderia thailandensis*. Так, *B. thailandensis* и *B. pseudomallei* имеют сходство на уровне 94 % в составе аминокислот [7]. *B. thailandensis* может быть ошибочно определена как *B. pseudomallei* в процессе идентификации с помощью биохимических тестов, используемых в системах API 20NE, и латекс-агглютинации. Только 60 % из 58 штаммов *B. pseudomallei*, исследованных API 20NE, были установлены правильно, а 5 % из них отнесены к неидентифицированным микроорганизмам [5].

B. pseudomallei – подобные штаммы по способности ассимилировать L-арабинозу и по наличию на поверхности их клеток антигена 200 kDa подразделяются на вирулентные (Ara⁻) и авирулентные (Ara⁺) [4]. Недавними исследованиями установлено, что среди считающихся авирулентными штаммов *B. thailandensis* встречаются и такие, которые имеют приобретенный геномный материал, очень похожий на гены капсульного полисахарида *B. pseudomallei* [9]. Вирулентные штаммы возбудителей сапа и мелиоидоза способны вызывать острые и хронические заболевания у людей, в том числе с летальным исхо-

дом, а также использоваться в качестве компонентов биологического оружия [8, 10]. В последнем случае решающим фактором является быстрота обнаружения патогена [2].

Бактерии *Burkholderia cepacia*, обладающие значительным родством с буркхольдериями группы «*pseudomallei*», обитают во внешней среде и не являются патогенными для здоровых людей. Однако они способны вызывать респираторные заболевания у пациентов с кистозным фиброзом, а также нозокомиальные инфекции у лиц, находящихся на лечении в палатах интенсивной терапии [6]. В связи с вышеизложенным представляют интерес методы, позволяющие отличать патогенные *B. pseudomallei* и *B. mallei* от близкородственных непатогенных в обычных условиях буркхольдерий.

Целью работы являлась разработка способа ускоренного линейного иммуноэлектрофореза (ЛИЭФ) для дифференцирования патогенных возбудителей сапа и мелиоидоза от непатогенных близкородственных буркхольдерий.

Материалы и методы

Для работы использовали типичные штаммы

возбудителей сапа и мелиоидоза с полноценной антигенной структурой из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, а также штаммы 3 близкородственных видов буркхольдерий: *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *B. gladioli*. Культивирование микроорганизмов, накопление биомассы, инактивирование микробной взвеси и получение водно-солевых экстрактов (ВСЭ) проводили как описано [3].

Гипериммунные кроличьи и козьи сыворотки получали путем внутрикожных или подкожных введений ацетонвысушенных микробных клеток *B. pseudomallei* 100 с использованием полного или неполного адьюванта Фрейнда («Calbiochem», США) в соотношении 1:1 в 8–10 точек вдоль позвоночника четырехкратно с интервалом в 1 неделю возрастающими дозами антигенов. Курс иммунизации состоял из двух или четырех циклов с интервалом 30 сут. Взятие крови проводили на 7-е сутки после заключительной инъекции. В работе использовали сыворотки, активность которых в РИД была не ниже 1:16.

ЛИЭФ проводили в следующих условиях: пластинку GelBond («Lonza», Швейцария) размером 8,5×10 см заливали 10 мл 1% раствора агарозы («Calbiochem», США), приготовленного на трис-вероналовом буфере, содержащем 0,1 г лактата кальция и 0,7 г азида натрия в 1 л буфера (рН 8,6), разведенном в 5 раз (этот же буфер использовали в электродных отсеках). На расстоянии 1 см от края пластинки с анодной стороны вырезали полосу геля шириной 4–5 см. Гель растапливали, охлаждали до 48 °С, добавляли к нему 5–10 объемных процентов сыворотки, содержащей антитела к исследуемым антигенам, и снова заливали на пластинку. Между гелем с сывороткой и исследуемыми пробами антигенов оставляли контактную полосу геля шириной 1–2 мм. После застывания геля с сывороткой на границе с контактной полосой располагали прямоугольные гель-образцы с антигенами, подлежащими исследованию. Гель-образцы готовили так же, как сыворотку, внося в охлажденный гель 5–10 объемных процентов исследуемых антигенов. К краям геля прикладывали мостики из 5 слоев фильтровальной бумаги, смоченные электродным буфером. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля (Н) — 4–5 В/см в течение 3–5 ч при комнатной температуре. После остановки электрофореза пластинку просматривали.

Результаты и обсуждение

Метод ЛИЭФ при напряженности электрического поля 1,5 В/см и температуре 10 °С в течение 18 ч был предложен [1] для определения характеристик большинства белков нормальных и патологических сывороток крови человека.

В процессе данного исследования были использованы различные условия постановки линейного иммуноэлектрофореза: применяли несколько буферных растворов с ионной силой 0,016–0,032 (трис-вероналовый с лактатом кальция, рН 8,6; барбитал-

трис-глициновый, рН 8,8), варьировали величину напряженности электрического поля (2–12 В/см), длительность (0,5–18 ч) и температуру (10–25 °С) проведения ЛИЭФ.

Только предлагаемая модификация метода позволила обнаружить антигены патогенных *B. pseudomallei* и *B. mallei* по наличию линий преципитата на границе гель-образца и геля с сыворотками иммунными кроличьими или козьими, содержащими антитела к искомому антигенному комплексу. Отрицательный результат указывал на отсутствие антигенов патогенных микроорганизмов, что дало возможность дифференцировать возбудители сапа и мелиоидоза от непатогенных близкородственных буркхольдерий. На рис. 1 представлены результаты изучения патогенных и непатогенных буркхольдерий в ускоренном ЛИЭФ. В пробе 4 наличие линии преципитата на границе гель-образца и геля с сывороткой иммунной свидетельствовало о присутствии антигенов патогенной *B. mallei*. Пробы 1, 2, 3 оказались отрицательными, так как линий преципитата не обнаружено.

Исследование штаммов по указанному признаку методом ускоренного ЛИЭФ в предлагаемых условиях с антителами, полученными к ВСЭ из ацетонвысушенных клеток возбудителей сапа и мелиоидоза, было использовано при изучении антигенного материала и сывороток. Наличие непрерывных преципитационных линий, образуемых расположенными рядом гель-образцами, свидетельствовало об идентичности исследуемых антигенов.

Результаты дифференцирования патогенных и непатогенных буркхольдерий и установления идентичности антигенов ускоренным ЛИЭФ показаны на рис. 2. Наличие линий преципитата на границе гель-образцов и геля с сывороткой иммунной говорило о присутствии в пробах 2 и 3 антигенов патогенных *B. pseudomallei* и *B. mallei*, а непрерывность преципитационных линий, образуемых расположенными рядом гель-образцами, — об идентичности искомым антигенов. ВСЭ *B. cepacia* и *B. thailandensis* не образовали линий преципитата на границе гель-образцов и геля с сывороткой иммунной.

Ускоренный ЛИЭФ позволил обнаружить общие и специфические антигены у патогенных и непатогенных буркхольдерий (рис. 3). Возбудители сапа и мелиоидоза выявлены в образцах 1, 2 и 4. При дли-

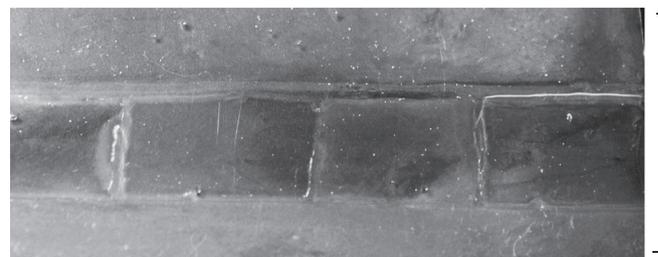


Рис. 1. Изучение патогенных и непатогенных буркхольдерий в ускоренном линейном иммуноэлектрофорезе (напряженность электрического поля — 4,8 В/см, время электрофореза — 4,5 ч при комнатной температуре). Использованы сыворотка кроличья к *B. pseudomallei* 100 и антигены:

1 — ВСЭ из ацетонвысушенных клеток *B. thailandensis* 264; 2 — *B. gladioli* 8495; 3 — *B. cepacia* 25416; 4 — *B. mallei* 10230

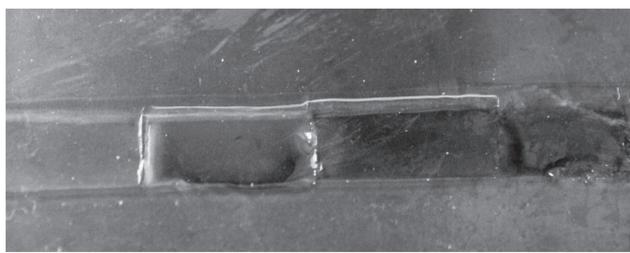


Рис. 2. Дифференцирование патогенных и непатогенных буркхольдерий и установление идентичности антигенов в ускоренном линейном иммуноэлектрофорезе (напряженность электрического поля – 4,2 В/см, время электрофореза – 5 ч при комнатной температуре). Использованы сыворотка козья к *B. mallei* 10230 и антигены:

1 – ВСЭ из ацетонвысушенных клеток *B. cepacia* 25416; 2 – *B. pseudomallei* 57576; 3 – *B. mallei* Ц-4; 4 – *B. thailandensis* 264

тельности ЛИЭФ 3,5 ч во всех пробах на расстоянии 5 см от контактной полосы были видны непрерывные преципитационные линии, что указывало на идентичность исследуемых общих антигенов штаммов *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. cepacia*.

Таким образом, разработан способ ускоренного ЛИЭФ для дифференцирования патогенных возбудителей сапа и мелиоидоза от непатогенных близкородственных буркхольдерий, отличающийся простотой и наглядностью. Метод пригоден для определения общих и специфических антигенов буркхольдерий, отбора иммунных сывороток, содержащих антитела к соответствующим антигенам, и может применяться как дополнительный аналитический метод выявления антигенов патогенных буркхольдерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксельсен Н., Крелль Й., Вееке Б. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение. М.: Мир; 1977. 216 с.
2. Антонов В.А., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Виктор Д.В., Сенина Т.В., Будченко А.А., Ткаченко Г.А., Алексеева В.В., Захарова И.Б., Савченко С.С., Зинченко О.В., Сорокина Ю.И., Алексеев В.В. Современные подходы к диагностике сапа и мелиоидоза. Идентификация и типирование *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 2(112):46–50.
3. Корсакова И.И., Храпова Н.П., Напалкова Г.М., Ломова Л.В., Дрефс Н.М., Голосеев Ю.А., Булатова Т.В. Сравнительный анализ иммунохимических методов исследования антигенов патогенных буркхольдерий. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 3(113):82–5.
4. Храпова Н.П., Алексеев В.В., Корсакова И.И., Дрефс Н.М., Ломова Л.В., Булатова Т.В., Напалкова Г.М. Применение сапных и мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдерий. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):66–9.
5. Glass M.B., Popovic T. Preliminary evaluation of the API 20NE and RapIDNF plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(1):479–83.
6. Harding S.V., Sarkar-Tyson M., Oyston P.C.F., Titball R.W. Immunogenic proteins of *Burkholderia pseudomallei* and uses thereof. Patent WO/2008/017826. PCT/GB2007/002989, 14.02.2008.
7. Nieves W., Heang J., Asakrah S., Bentrup K.H., Roy C.J., Morici L.A. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization. *PLoS ONE*. 2010; 5(12):e14361.
8. Sarkar-Tyson M., Titball R.W. Progress toward development of vaccines against melioidosis: A review. *Clin. Ther.* 2010; 32(8):1437–45.
9. Sim B.M.Q., Chantratita N., Ooi W.F., Nandi T., Tewhey R., Wuthiekanun V., Thaipadungpanit J., Tumapa S., Ariyaratne P., Sung W.-K., Sem X.H., Chua H.H., Ramnarayanan K., Lin C.H., Liu Y., Feil E.J., Glass M.B., Tan G., Peacock S.J., Tan P. Genomic acquisition of a capsular polysaccharide virulence cluster by non-pathogenic *Burkholderia* isolates. *Genome Biol.* 2010; 11:R89.

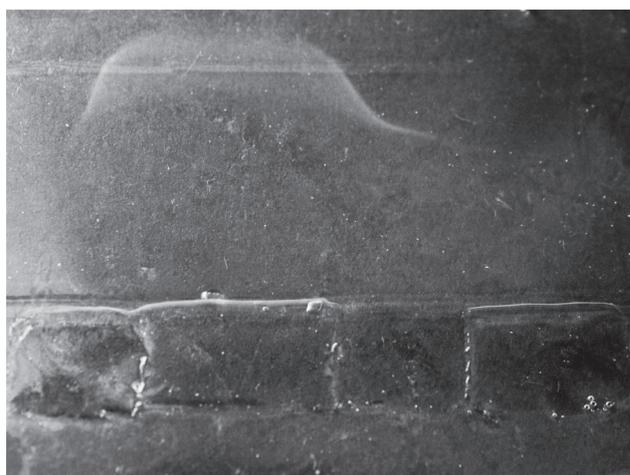


Рис. 3. Обнаружение общих и специфических антигенов у патогенных и непатогенных буркхольдерий в ускоренном линейном иммуноэлектрофорезе (напряженность электрического поля – 4,2 В/см, время электрофореза – 3,5 ч при комнатной температуре). Использованы сыворотка кроличья к *B. pseudomallei* 100 и антигены:

1 – ВСЭ из ацетонвысушенных клеток *B. pseudomallei* 57274; 2 – *B. mallei* 10230; 3 – *B. cepacia* 25416; 4 – *B. pseudomallei* 60913

10. Whitlock G.C., Robida M.D., Judy B.M., Qazi O., Brown K.A., Deeraksa A., Taylor K., Massey S., Loskutov A., Borovkov A.Y., Brown K., Cano J.A., Magee D.M., Torres A.G., Estes D.M., Sykes K.F. Protective antigens against glanders identified by expression library immunization. *Front Microbiol.* 2011; 2:227.

References

1. Aksel'sen N., Krell I., Veeke B. [Guidelines on Quantitative Immune-Electrophoresis. Techniques and Applications]. M.: Mir; 1977. 216 p.
2. Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Prokhvatilova E.V., Viktorov D.V., Senina T.V., Budchenko A.A., Tkachenko G.A., Alekseeva V.V., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Zinchenko O.V., Sorokina Yu.I., Alekseev V.V. [Modern approaches to the detection of glanders and melioidosis. Identification and typing of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 2(112):46–50.
3. Korsakova I.I., Khrapova N.P., Napalkova G.M., Lomova L.V., Drefs N.M., Goloseev Yu.A., Bulatova T.V. [Comparative analysis of immunochemical methods applied for studies of pathogenic Burkholderia antigens]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3(113):82–5.
4. Khrapova N.P., Alekseev V.V., Korsakova I.I., Drefs N.M., Lomova L.V., Bulatova T.V., Napalkova G.M. [Application of glanders and melioidosis monoclonal antibodies of different epitope specificity for pathogenic Burkholderia detection and identification]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):66–9.
5. Glass M.B., Popovic T. Preliminary evaluation of the API 20NE and RapIDNF plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(1):479–83.
6. Harding S.V., Sarkar-Tyson M., Oyston P.C.F., Titball R.W. Immunogenic proteins of *Burkholderia pseudomallei* and uses thereof. Patent WO/2008/017826. PCT/GB2007/002989, 14.02.2008.
7. Nieves W., Heang J., Asakrah S., Bentrup K.H., Roy C.J., Morici L.A. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization. *PLoS ONE*. 2010; 5(12):e14361.
8. Sarkar-Tyson M., Titball R.W. Progress toward development of vaccines against melioidosis: A review. *Clin. Ther.* 2010; 32(8):1437–45.
9. Sim B.M.Q., Chantratita N., Ooi W.F., Nandi T., Tewhey R., Wuthiekanun V., Thaipadungpanit J., Tumapa S., Ariyaratne P., Sung W.-K., Sem X.H., Chua H.H., Ramnarayanan K., Lin C.H., Liu Y., Feil E.J., Glass M.B., Tan G., Peacock S.J., Tan P. Genomic acquisition of a capsular polysaccharide virulence cluster by non-pathogenic *Burkholderia* isolates. *Genome Biol.* 2010; 11:R89.
10. Whitlock G.C., Robida M.D., Judy B.M., Qazi O., Brown K.A., Deeraksa A., Taylor K., Massey S., Loskutov A., Borovkov A.Y., Brown K., Cano J.A., Magee D.M., Torres A.G., Estes D.M., Sykes K.F. Protective antigens against glanders identified by expression library immunization. *Front Microbiol.* 2011; 2:227.

Authors:

Korsakova I.I., Khrapova N.P., Napalkova G.M., Lomova L.V., Bulatova T.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

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

Поступила 15.05.13.