

И.И.Корсакова, Н.П.Храпова, Г.М.Напалкова, Л.В.Ломова, Н.М.Дрефс, Ю.А.Голосеев, Т.В.Булатова

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИГЕНОВ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Изучены иммунохимические свойства антигенных препаратов, спектр и молекулярные массы составляющих их компонентов, показано значение вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, реакции иммунодиффузии, иммуноэлектрофореза, ракетного иммуноэлектрофореза со специфическими сыворотками для идентификации и дифференциации буркхольдерий. Наиболее информативным методом следует признать РИЭФ, который дает возможность дифференцировать патогенные буркхольдерии от непатогенных для человека в обычных условиях.

Ключевые слова: антигенные комплексы патогенных и непатогенных буркхольдерий, иммунохимическая идентификация и дифференциация.

I.I.Korsakova, N.P.Khrapova, G.M.Napalkova, L.V.Lomova, N.M.Drefs, Yu.A.Goloseev, T.V.Bulatova

Comparative Analysis of Immunochemical Methods Applied for Studies of Pathogenic *Burkholderia* Antigens

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd

Studied are immunochemical properties of antigen preparations, the spectrum and molar masses of the components contained. Demonstrated is the significance of vertical SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, immunodiffusion test, immunoelectrophoresis assay, rocket immunoelectrophoresis with specific sera for identification and differentiation of *Burkholderia*. Rocket immunoelectrophoresis should be viewed as the most informative method which allows for differentiation between pathogenic and non-pathogenic for humans *Burkholderia* under usual terms.

Key words: antigen complexes of pathogenic and non-pathogenic *Burkholderia*, immunochemical identification and differentiation.

Интерес исследователей к изучению буркхольдерий, относящихся к группе *pseudomallei* и *Burkholderia cepacia*-комплексу, сохраняется до настоящего времени, что объясняется рядом причин. Возбудитель мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, способный вызывать тяжелые заболевания у людей и животных, обитает в природе, главным образом в Юго-восточной Азии, Северной Австралии, некоторых районах Африки, Северной и Центральной Америки [6, 7, 9]. Хотя исторически мелиоидоз считается относительно редким заболеванием, за последний период его частота возросла в ряде стран в связи с увеличением посещений эндемичных по данной инфекции регионов мира и совершенствованием методов лабораторной диагностики [2].

Привлекает внимание и близкородственный возбудитель сапа *Burkholderia mallei*, способный вызывать острые и хронические заболевания у людей, профессионально занятых уходом за животными. Настороженность в отношении *B. pseudomallei* и *B. mallei* как возможных агентов биотерроризма значительно возросла [2]. Из объектов окружающей среды в процессе эпидемиологического мониторинга выделяются фенотипически и генотипически родственные *B. pseudomallei* и *B. mallei* буркхольдерии *B. cepacia*-комплекса и *Burkholderia thailandensis*, близкие между собой по антигенному составу и характеризующиеся вариабельностью и гетерогенно-

стью диагностических признаков, что не позволяет идентифицировать штаммы до видовой принадлежности с помощью полуавтоматических систем [1, 8].

Перспективным направлением работы остается обнаружение и идентификация экстрацеллюлярных и связанных с поверхностью клеток антигенов патогенных буркхольдерий, являющихся общими, видовыми, ассоциированными с иммуногенностью и вирулентностью данных возбудителей, на основе которых могут быть разработаны новые реагенты для диагностических тестов и созданы вакцинные препараты для специфической профилактики сапа и мелиоидоза.

Цель работы – проведение иммунохимического анализа антигенных комплексов патогенных и непатогенных для человека буркхольдерий различными методами, установление наличия общих и видовых антигенов у *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *B. gladioli*, определение ценности каждого метода на этапах дифференциации буркхольдерий.

Материалы и методы

Для работы использовали типичные штаммы возбудителей сапа и мелиоидоза с полноценной антигенной структурой из коллекции ФКУЗ «ВолгоградНИПЧИ»: *B. mallei* – 13, *B. pseudomal-*

lei – 60 штаммов, мутантные штаммы *B. mallei* 10230-11-2, *B. pseudomallei* 100-6-1, 111-6-1, а также штаммы 3 близкородственных видов буркхольдерий: *B. thailandensis* – 5, *B. cepacia* – 14, *B. gladioli* – 3.

Культивирование микроорганизмов и накопление биомассы проводили на бифазной питательной среде, состоящей из Nutrient-агара («Difco»), рН 6,8, на который насливали Nutrient-бульон («Difco»), рН 6,8, при 37 °С в течение 48 ч. Микробную взвесь инактивировали добавлением 4 объемов охлажденного до –30 °С ацетона. Для получения водно-солевых экстрактов (ВСЭ) к 1 г высушенной ацетоном клеточной массы добавляли 60 мл забуференного 0,15 М раствора NaCl (рН 7,2) и 0,05 % азида натрия. Взвесь перемешивали на магнитной мешалке при отсутствии пены в течение 1 сут при 4 °С. Антигенные комплексы экстрагировали ультразвуковой обработкой клеточной суспензии с помощью дезинтегратора Artek-150 («Artek», США) в течение 2 мин при частоте 22 кГц и мощности 160 Вт. Полученный материал центрифугировали при 15000 об/мин в течение 30 мин с охлаждением. Супернатант отделяли, концентрировали и диализовали против дистиллированной воды на мембране РМ-10 («Diaflo», США), затем разливали по аликвотам и хранили при –10 °С.

Антиген 8 (Аг 8) получали из высушенных ацетоном микробных клеток экстракцией формамидом по методу Фуллера в модификации, которая заключалась в экстрагировании при температуре 20 °С [4]. Экстрацеллюлярные антигены (ЭЦА) получали, как указано [4].

Гипериммунные кроличьи и козьи сыворотки получали путем внутрикожных или подкожных введений целых микробных клеток, ЭЦА или Аг 8 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 антиге-

нов. 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 1:32.

Иммунохимические свойства антигенных препаратов, спектр и молекулярные массы (м.м.) составляющих их компонентов определяли методом вертикального электрофореза в 7,5 и 10 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) [10], в реакции иммунодиффузии (РИД) [5], при иммуноэлектрофорезе (ИЭФ) [5] и ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) [3] со специфическими сыворотками. Определение химического состава полученных антигенов (концентрация белка и углеводов) осуществляли с использованием методов O.Lowry и M. Dubois соответственно [4, 5].

Результаты и обсуждение

С помощью модифицированной формамидной экстракции нам удалось выделить из капсулы клеток возбудителей сапа и мелиоидоза гликопротеины, которые позволяют дифференцировать указанные микроорганизмы от близкородственных буркхольдерий и других микробных видов. К ним относится антиген 8, имеющий м.м. 200 kDa, что установлено при электрофорезе в полиакриламидном геле. Детальное изучение в процессе пролонгированного электрофореза в полиакриламидном геле состава Аг 8 выявило, что он имеет несколько субъединиц, располагающихся в пределах м.м. от 150 до 220 kDa. При ИЭФ Аг 8 формирует характерную дугу преципитата в электро-нейтральной зоне. Установлено, что концентрация белка в препарате составляла 0,4–3 мг/мл, а углеводов – 3,07–48 мг/мл.

При использовании в РИД (таблица) микробных клеток, а также выделенного из них антиген-

Результаты обнаружения антигенов буркхольдерий различными методами

Метод исследования	Сыворотка к антигену	Антиген возбудителей				
		<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. thailandensis</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i>
РИД	Аг 8	+	+	–	–	–
	ЭЦА <i>B. pseudomallei</i> C-141	+	+	+	–	–
	ЭЦА <i>B. mallei</i> 10230	+	+	+	–	–
	ЭЦА <i>B. thailandensis</i> 264	+	+	+	±	±
	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> C-141	+	+	±	±	±
	ВСЭ <i>B. thailandensis</i> 264	+	+	+	±	±
	ВСЭ смеси 5 штаммов <i>B. thailandensis</i>	+	+	+	±	±
ИЭФ	Аг 8	+	+	±	–	–
	ЭЦА <i>B. pseudomallei</i> C-141	+	+	+	–	–
	ЭЦА <i>B. mallei</i> 10230	+	+	+	–	–
	ЭЦА <i>B. thailandensis</i> 264	+	+	+	–	–
	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 100	+	+	–	–	–
РИЭФ	Аг 8	+	+	–	–	–
ПААГ-ДСН	нет	±	±	±	±	±

¹Ацетонвысушенные микробные клетки.

²ВСЭ исследуемых штаммов.

Примечания: «+» – антиген определяется; «–» – не определяется; «±» – определяется непостоянно.

ного материала ни один из 5 штаммов *B. cepacia* и 3 штаммов *B. gladioli* не взаимодействовал с сывороткой, полученной к ЭЦА *B. pseudomallei* С-141. Эти же штаммы и авирулентный вариант возбудителя сапа дали отрицательные результаты с сывороткой, полученной к ЭЦА *B. mallei* 10230, а с сывороткой против ВСЭ *B. pseudomallei* С-141 результаты были отрицательными с единичными штаммами *B. cepacia*, *B. thailandensis*, *B. gladioli*. С сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264 все исследованные штаммы, кроме *B. cepacia* 423 и *B. gladioli* 8495, дали положительный результат. При постановке реакции с сывороткой к ВСЭ *B. thailandensis* 264 из всех исследованных штаммов с последней не прореагировали по 2 штамма *B. cepacia* (423, 8237) и *B. gladioli* (8495, 1298). РИД оказалась положительной со всеми штаммами, за исключением *B. cepacia* 1934, 8237, 423 и *B. gladioli* 8495, при использовании сыворотки против ВСЭ смеси пяти штаммов *B. thailandensis*. С сывороткой к ЭЦА *B. cepacia* 25416 преципитация обнаружена только у ВСЭ гомологичного штамма и возбудителей сапа и мелиоидоза. Положительные результаты с козьей сывороткой, содержащей специфические антитела к Аг 8, получены лишь для *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Таким образом, реакция иммунодиффузии при условии применения поликлональных сывороток не позволяла во всех случаях четко дифференцировать различные виды буркхольдерий между собой.

Изучены клеточные антигенные комплексы патогенных буркхольдерий и близкородственных видов микроорганизмов с помощью ИЭФ с гомологичными и гетерологичными сыворотками. С сывороткой к Аг 8 *B. pseudomallei* 100 взаимодействовали антигены как вирулентных, так и авирулентных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, всех испытанных штаммов *B. thailandensis*. При этом спектр антигенов у них имел некоторые отличия. Близкородственные буркхольдерии *B. cepacia* 25416 и *B. gladioli* с указанной сывороткой не реагировали. Смесь антигенов ВСЭ *B. pseudomallei* 100 давала полосы преципитации в ИЭФ со всеми изученными сыворотками. Исследование ВСЭ *B. pseudomallei* 100, *B. mallei* 10230 и близкородственных штаммов *B. thailandensis* 251, 264, 295, 299, *B. cepacia* 25416, *B. gladioli* 8494, 8495 в ИЭФ с козьей иммунной сывороткой, полученной к Аг 8, показало его отсутствие во всех микробных клетках, кроме возбудителей сапа и мелиоидоза.

Нами установлено, что все оппортунистические патогены, т.е. непатогенные для здорового человека буркхольдерии, кроме *B. thailandensis*, не имеют общих антигенов с ЭЦА *B. pseudomallei* и *B. mallei*; антигенный состав различных штаммов *B. thailandensis* и, в большей степени, *B. cepacia* неоднороден. С помощью ИЭФ возможно отличить *B. pseudomallei* и *B. mallei* от других буркхольдерий при условии применения сыворотки против Аг 8 и ВСЭ исследуемых штаммов. Для целей дифференциации

и идентификации патогенных буркхольдерий необходимо использовать высокоочищенные антигенные препараты, полученные из капсулы клеток возбудителей сапа и мелиоидоза.

Наличие пиков преципитатов в геле со специфическими иммуноглобулинами против Аг 8 у всех исследуемых штаммов при общепринятых условиях РИЭФ не позволяло дифференцировать патогенные *B. pseudomallei* и *B. mallei* от близкородственных буркхольдерий. В результате исследований методом РИЭФ в нашей модификации [3] установлено, что с той же сывороткой через 4 ч после начала электрофореза обнаруживались только антигены возбудителей сапа и мелиоидоза. С антигенами авирулентных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, а также с близкородственными культурами результаты были отрицательными. Предложенную постановку РИЭФ можно использовать для дифференцирования сапных и мелиоидозных микробов от других видов буркхольдерий.

В работе исследовали методом электрофореза в 10 % ПААГ-ДСН (5 мА, 20 В, 22 ч) ВСЭ 6 штаммов *B. pseudomallei*, 2 – *B. mallei*, 5 – *B. thailandensis*, 4 – *B. cepacia*, 3 – *B. gladioli*. Установлено, что для всех исследованных штаммов характерно наличие значительного количества антигенных компонентов белково-углеводной природы (от 8 до 15) с широким диапазоном м.м. (14–500 kDa). Мажорными антигенами возбудителя мелиоидоза являлись гликопротеины с м.м. 220, 200, 97, 66, 57, 36 и 23 kDa. Состав компонентов у возбудителя сапа несколько отличался: наряду с биополимерами 220, 97, 66, 57 kDa присутствовали антигены 180, 160, 50 и 45 kDa. В составе всех испытанных штаммов *B. thailandensis* обнаружены антигены 205 и 66 kDa, в области м.м. 116–500 kDa набор компонентов у разных штаммов варьировал, штамм 251 имел мажорный компонент в зоне 205–500 kDa. Штаммы *B. cepacia* значительно отличались между собой и по количеству, и по м.м. антигенных компонентов (31–300 kDa). Близкородственные *B. gladioli* имели набор биополимерных антигенов, не идентичный *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* и *B. cepacia*, но с общими компонентами в зонах м.м. 205, 97, 66 и 53 kDa.

Таким образом, оппортунистические бактерии *B. cepacia*-комплекса и *B. gladioli* характеризуются большей вариабельностью антигенного состава по сравнению с возбудителями сапа, мелиоидоза и *B. thailandensis*. Наличие нескольких общих биополимерных компонентов у всех исследованных видов буркхольдерий затрудняет выбор антигена, на основе которого можно проводить их дифференциацию и идентификацию. Для этих целей метод электрофореза в ПААГ-ДСН целесообразно использовать как дополнительный.

Не все иммунохимические методы с применением сывороток к группоспецифическому для возбудителей сапа и мелиоидоза Аг 8 позволяют отличить их от близкородственных патогенов. Наиболее информативным методом из использованных в настоя-

щей работе следует признать РИЭФ, который дает возможность дифференцировать патогенные буркхольдерии от непатогенных для человека в обычных условиях. Вариабельность данных, полученных всем комплексом методов, свидетельствует о необходимости разработки способов идентификации антигенов-маркеров и создания их стандартных образцов, отражающих индивидуальные особенности видов буркхольдерий, имеющих медицинское значение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.А., Илюхин В.И., Сенина Т.В., Лобойко А.Д., Ткаченко Г.А., Зинченко О.В. и др. Фенотипическая и генотипическая идентификация бактерий комплекса *Burkholderia cepacia*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 4:78–82.
2. 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.
3. Корсакова И.И., Напалкова Г.М., Храпова Н.П., Пивень Н.Н., Ломова Л.В. Способ дифференцирования патогенных от непатогенных буркхольдерий. Патент 2378360 РФ, опубл. 10.01.2010.
4. Пивень Н.Н., Авророва И.В., Жукова С.И., Алексеев В.В., Храпова Н.П., Корсакова И.И. и др. Иммуногенность поверхностных и капсульных антигенов *Burkholderia mallei*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 1:47–52.
5. Пивень Н.Н., Илюхин В.И., Замарин А.Е., Алексеев В.В., Васильев В.П. Адекватный выбор антигенов при серодиагностике экспериментального мелиоидоза. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 2:49–53.
6. Чухланцев Д.А., Маракулин И.В., Дармов И.В. Использование ПЦР для идентификации и межвидового дифференцирования возбудителей сапа и мелиоидоза. Пробл. особо опасных инф. 2008; 97:63–6.
7. Bossi P., Guihot A., Briccare F. Emerging or re-emerging infections that can be used for bioterrorism. Presse Med. 2005; 34(2, Pt. 2):149–55.
8. Elvin S.J., Healy G.D., Williamson E.D., Eyles J.E., Smither S.J., Sarkar-Tyson M. et al. Immunogenic agents against *Burkholderia pseudomallei* and/or *Burkholderia mallei*, comprising lipopolysac-

charide, capsular polysaccharide and/or proteins from *Burkholderia pseudomallei*. Patent WO/2007/036735, PCTT/GB2006/003628, 05.04.2007.

9. Sarkar-Tyson M., Titball R.W. Progress toward development of vaccines against melioidosis: A review. Clin. Ther. 2010; 32(8):1437–45.

10. Westermeyer R. Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations. 4th ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 2005. 406 p.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Senina T.V., Loboyko A.D., Tkachenko G.A., Zinchenko O.V. et al. [Phenotype and genotype identification of *Burkholderia cepacia* bacteria complex]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4:78–82.
2. Ilyukhin V.I., Senina T.V., Plekhanova N.G., Antonov V.A., Merinova L.K., Seimova I.K. [*Burkholderia thailandensis*: biological properties, identification and taxonomic position]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2002; 1:7–11.
3. Korsakova I.I., Napalkova G.M., Khrapova N.P., Piven' N.N., Lomova L.V. [Method of differentiation between pathogenic and non-pathogenic *Burkholderia*]. RF Patent 2378360.
4. Piven' N.N., Avrorova I.V., Zhukova S.I., Alekseev V.V., Khrapova N.P., Korsakova I.I. et al. [Immunogenicity of surface and capsular *Burkholderia mallei* antigens]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 1:47–52.
5. Piven' N.N., Ilyukhin V.I., Zamarin A.E., Alekseev V.V., Vasil'ev V.P. [Adequate selection of antigens in case of serodiagnostics of experimental melioidosis]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 2:49–53.
6. Chukhlantsev D.A., Marakulin I.V., Darmov I.V. [Application of PCR for identification and interspecific differentiation of glanders and melioidosis etiologic agents]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 97:63–6.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 24.11.10.