

УДК 616:619

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
BORDETELLA BRONCHISEPTICA С ПОМОЩЬЮ ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА
DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE OF SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF
BORDETELLA BRONCHISEPTICA BY IMMUNOELECTROPHORESIS**

**А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Е.Г. Семанин, Ю.Б. Васильева
A.V. Mastilenko, D.G. Sverkalova, E.G. Semanin, Yu.B. Vasileva**

**Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и
биотехнологии Ульяновской ГСХА
The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture**

Bordetellosis fairly widespread disease in animals and humans. Identification of Bordetella bronchiseptica by using microbiological methods is quite complicated. One of the leading methods of accurate identification of the antigenic composition of the microbial mixture is immunoelectrophoresis.

Бордетеллез довольно широко распространенное заболевание животных и человека. Достаточно сказать, что по данным ВОЗ, ежегодно заболевают коклюшем до 60 млн. человек. У животных проблему заболеваний, вызванных *Bordetella bronchiseptica*, стали рассматривать уже в начале XX века в странах Европы и США.[3]. Однако на территории Российской Федерации до настоящего времени серьезно этим вопросом не занимались.

Идентификация *Bordetella bronchiseptica* с помощью микробиологических методов достаточно сложна, так как микроорганизм является слабым ферментером. В связи с этим встает вопрос о разработке скрининговых методов обнаружения возбудителя в биоматериале.

Одним из ведущих методов точной идентификации антигенного состава микробной смеси является иммуноэлектрофорез.[2].

Иммуноэлектрофоретический анализ представляет собой сочетание электрофореза в агаровом геле с иммунодиффузией.[1].

Для апробации предложенной методики были использованы штаммы *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis* а также других грамотрицательных и грамположительных бактерий из коллекции музея кафедры МВЭиВСЭ ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА».

Для получения бактериальной массы были использованы искусственные питательные среды – мясо-пептонный и казеиново-угольный агары. Также было использовано следующее оборудование: термостат с постоянной температурой 37°C, центрифуга (до 3000 об/мин), набор лабораторной посуды.

Для получения антигенной взвеси бактериальных клеток был применен метод ультразвуковой дезинтеграции на аппарате Soniper 150 MSE (Великобритания) с последующим центрифугированием исходной смеси.

Электрофорез проводили в камере SE-1 («Helicon») при использовании постоянного источника тока «Эльф-4» (ООО «ДНК-Технология», Москва). Был использован трис-боратный буфер с pH-8,3. Режим электрофореза: 200В, 100mA, 5,0Вт в течение 30 минут. В качестве поддерживающей среды был использован 2% агарозный гель.

Для проведения иммунодиффузии была использована антисыворотка к *Bordetella bronchiseptica*, полученная при проведении гипериммунизации кроликов. Иммунодиффузия продолжалась 24-48 часов при комнатной температуре во влажной камере.

Вначале нами был проведен собственно электрофорез антигенов в агарозном геле в течение 30 минут. Толщина геля составляла 3-4 мм. Затем в канавку, параллельную миграции антигенов, была помещена гипериммунная сыворотка. Для равномерной диффузии пластина с гелем находилась во влажной камере в течение 24-48 часов. После этого линии преципитации наблюдали в боковом освещении на темном фоне (рис.1,2,3). Гели документировали и проводили анализ.

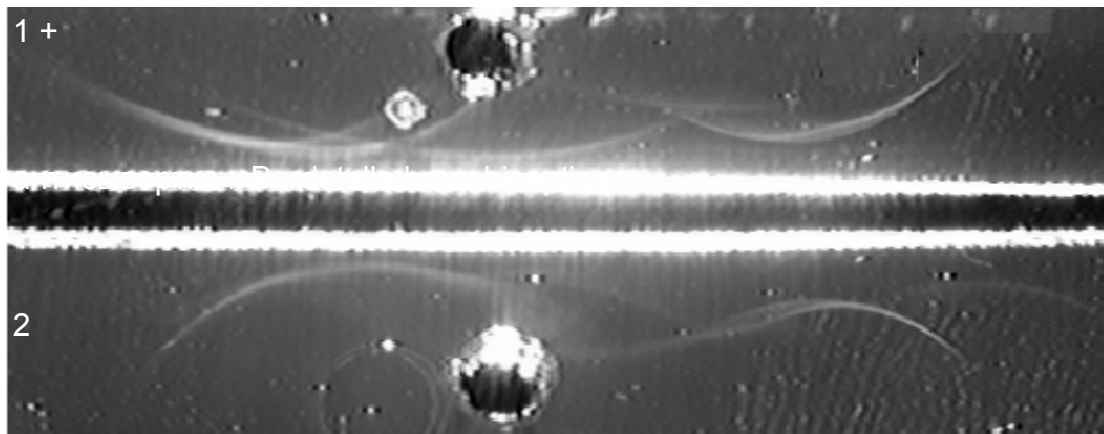


Рис.1. Иммуноэлектрофореграмма антигенов *Bordetella bronchiseptica* (лунка 1) и *Bordetella parapertussis* (лунка 2), полученная с помощью кроличьей антисыворотки к *Bordetella bronchiseptica*.

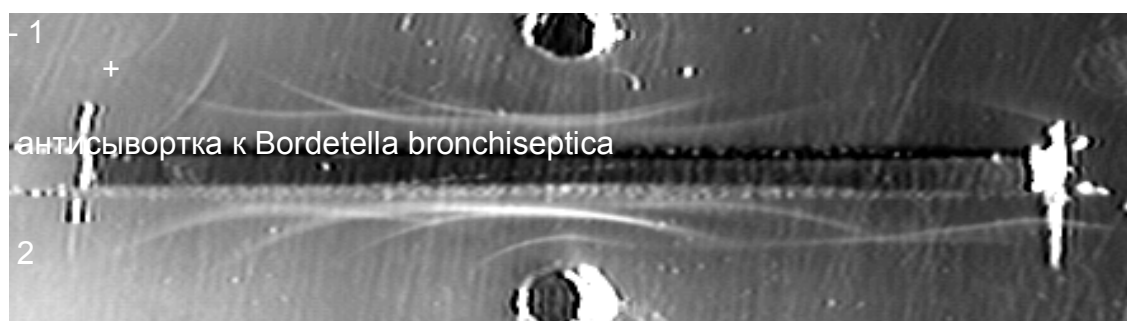


Рис.2 Иммуноэлектрофореграмма антигенов *Bordetella bronchiseptica* штаммов №214 (лунка 1) и №22067 (лунка 2), полученная с помощью кроличьей антисыворотки к *Bordetella bronchiseptica*.

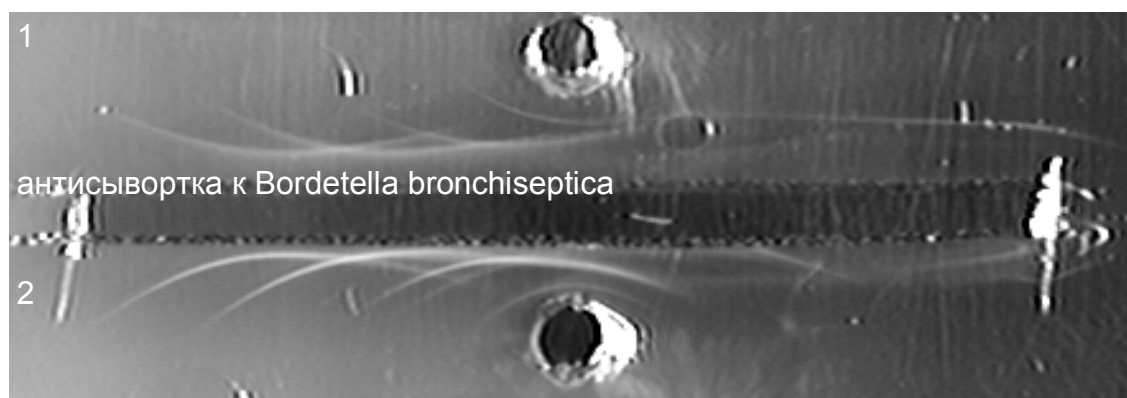


Рис.3 Иммуноэлектрофореграмма антигенов *Bordetella bronchiseptica* штаммов №22067 (лунка 1) и штамма №10608 (лунка 2), полученная с помощью кроличьей антисыворотки к *Bordetella bronchiseptica*.

При анализе данных иммуноэлектрофореза нам удалось идентифицировать до 6 антигенов *Bordetella bronchiseptica*, преципитированных гипериммунной кроличьей сывороткой. Также данная сыворотка частично преципитирует антигены *Bordetella parapertussis* (рис.1), что связано с наличием общих антигенных детерминант. По всем имеющимся в нашем распоряжении штаммам *Bordetella bronchiseptica* наблюдается идентичность количества и расположения преципитатов.

В данной работе был применен метод иммуноэлектрофореза с использованием достаточно доступного трис-боратонного буфера с pH-8,3.

В результате данного эксперимента удалось идентифицировать до 6 антигенов *Bordetella bronchiseptica*, полученных с помощью ультразвуковой дезинтеграции бактериальной массы.

По всем штаммам *Bordetella bronchiseptica* на иммуноэлектрофореграммах наблюдается идентичность количества и расположения преципитатов.

Таким образом, при наличии соответствующей преципитирующей антисыворотки данный метод позволяет исследовать любую антигенную смесь на идентичность с *Bordetella bronchiseptica*, а при наличии антигенной взвеси чистой культуры *Bordetella bronchiseptica* - идентифицировать любую сыворотку на наличие антител к этим антигенам.

Литература

1. Фримель, Х. и др. Иммунологические методы. М.: Мир, 1979.
2. Чарный, В.И. Установление видовой специфичности белков крови. М: Медицина, 1976.
3. Ross, R., J.Munoz and C.Cameron. Histamin-sensitizing Factor, Mouse-protective Antigens, and Other Antigens of Some Members of the Genus *Bordetella*. Journal of Bacteriology, July 1969, No.1, Volume 99, p.57-44.