

Сугирбаева Г.Д., Матраимов Б., Кошеметов Ж.К.

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА К ВОЗБУДИТЕЛЮ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

G.D. Sugirbaeva, M.B. Matraimov, Zh.K. Koshemetov

RECEIVING OF SPECIFIC ANTIGEN TO *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

УДК: 619:616-07/619.3

В данной работе приведены результаты исследования по приготовлению активных и специфических антигенов к возбудителю *C. perfringens*. Для получения антигенов были использованы два метода. Наиболее активный антиген к возбудителю *C. perfringens* получен с использованием второго метода (соматический антиген).

Ключевые слова: антиген, антисыворотка, *C. perfringens*, тест-система

The result of researches on preparation of the active and specific antigens to *C. perfringens* was presented in this article. Two methods were used for antigens receiving. The most active antigen to *C. perfringens* was obtained with using the second method (the somatic antigen).

Key words: antigen, antiserum, *C. perfringens*, test-system.

Введение

C. perfringens – грамположительная строго анаэробная (за исключением *C. perfringens* типа А) спорообразующая палочковидная бактерия рода *Clostridium*. Бактерию можно найти в самых разных местах обитания, таких как нормальная микрофлора человеческого желудочно-кишечного тракта и окружающая среда, таких как сточные воды и почва [1]. *C. perfringens* вырабатывают экзотоксин, сложный по своему составу [2]. *C. perfringens* выделяет экзотоксин, содержащий различные токсические вещества: миотоксин, гемолизин, нейротоксин. *C. perfringens* способен также образовывать токсины в продуктах после их тепловой обработки и при последующем хранении при 18–20 °С и выше, причем в результате размножения *C. perfringens* не происходит заметного изменения органолептических свойств продукта (исключением является молоко). По антигенной структуре и токсигенным свойствам *C. perfringens* подразделяют на шесть типов: А, В, С, D, Е, F, из которых типы В, С, D, Е – патогенны для домашних животных (овец, телят, поросят и др.), а для человека патогенны типы А, F и редко С, D [5].

Несмотря на то, что в настоящее время существуют достаточное количество методов для диагностики и идентификации *C. perfringens*, проблема в высокочувствительном и специфичном методе диагностики остается актуальной для ветеринарии.

Диагностика *C. perfringens* основана на комплексной оценке анамнестических, клинических и лабораторных данных. Необходимо отметить, что ведущую роль в установлении и подтверждении диагноза инфекции *C. perfringens* играют лабораторные методы исследования по обнаружению антигена самого возбудителя и его токсинов [4].

В данной работе отражены результаты получения активных и специфических антигенов и комплексных диагностических сывороток против штамма *Clostridium/Saigas/2010/ZKO/KZ* возбудителя *C. perfringens*, выделенного от павшего сайгака из Западно-Казахстанской области в 2010 году.

Материалы и методы

Возбудитель. В работе использовали штамм *Clostridium/Saigas/2010/ZKO/KZ*, выделенный от павшего сайгака из Западно-Казахстанской области в 2010 г.

Приготовление среды Китта-Тароцци. Печень крупного рогатого скота нарезают кусочками по 1,0–1,5 г, заливают по весу тройным количеством МПБ или бульона Хоттингера рН 7,4–7,6 и кипятят 30 мин. Бульон отфильтровывают, а печень промывают под краном на сите и подсушивают фильтровальной бумагой. Затем в каждую пробирку кладут по 4–5 кусочка отмытой печени и наливают отфильтрованный бульон по 7–10 см³, сверху бульона заливают слоем вазелинового масла и стерелизуют при 110 °С в течение 30 мин. Перед использованием среду нагревают.

Культивирование возбудителя *C. perfringens*. Микробную массу штамма *Clostridium/Saigas/2010/ZKO/KZ* получали путем культивирования на среде Китта-Тароцци рН 7,2–7,4 в течение 48 ч при 37 °С, для усиления роста в засеянную питательную среду добавляли 1% глюкозы.

Инактивация. Полученную бактериальную массу инактивировали формалином в конечной концентрации 0,6 % в течение 10 сут при 37 °С, периодически перемешивая 2–3 раза в сут. Проверку полноты инактивации штамма *Clostridium/Saigas/2010/ZKO/KZ* возбудителя *C. perfringens* определяли на мышатах и на среде Китта-Тароцци. Мыши должны оставаться живыми в течение 7 сут и на среде Китта-Тароцци роста бактерий в течение трех суток не должно быть.

Получение антигена. Для приготовления антигена *C. perfringens* применяли 2 способа очистки наработанной и инактивированной бактериальной массы:

1 способ – по методу Grosset [3], микробные клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин и трижды отмывали физиологическим раствором с рН 7,0–7,2. Осадок микробных клеток разбавляли небольшим объемом дистиллированной воды до получения взвеси 50 млрд. в 1 см³ (по оптическому стандарту мутности). Микробные клетки разрушали путем замораживания минус 60° и оттаивания 37°С от 12 до 14 раз. После послед-

него оттаивания взвесь центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве антигена.

2 способ – получение соматического антигена, микробные клетки концентрировали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 20 мин и затем трижды отмывали большими объемами физиологического раствора pH 7,0-7,2. Осадок микробных клеток разбавляли тем же раствором до получения взвеси 50 млрд. в 1 см³ (по оптическому стандарту мутности), прогревали в водяной бане при 100 °C в течение 3 час.

Концентрацию белка в антигенах из штамма *Clostridium/Saigas/2010/ZKO/KZ* возбудителя *C. perfringens* проверяли с помощью спектрофотометра *Boeco S-30* по методу Лоури [6].

В качестве доноров специфических антител применяли кроликов с живой масс 2-2,5 кг, овец, коз местных пород.

Результаты исследования

Для приготовления антигена при возбудителе *C. perfringens* были использованы 2 способа очистки наработанной и инактивированной бактериальной массы.

Концентрацию белка в антигенах из штамма *Clostridium/Saigas/2010/ZKO/KZ* возбудителя *C. perfringens* проверяли с помощью спектрофотометра *Boeco S-30*. Концентрация белка в приготовленных антигенах из штамма *Clostridium/Saigas/2010/ZKO/KZ* возбудителя *C. perfringens* по методу *Grosset* составила 17,2 мг/мл, а по методу кипячения (соматический антиген) 204,9 мг/мл.

Антигенную активность полученных препаратов проверяли в РДП, результаты исследования представлены в таблице.

Таблица - Активность приготовленных антигенов в РДП

Исследуемые антигены	штамм	Активность в РДП	
		с СС	с СН
AgC 1 - по методу <i>Grosset</i>	<i>Clostridium/Saigas/2010/ZKO/KZ</i>	1:16	-
AgC 2 - по методу кипячения		1:32	-
Примечания			

- 1 «-» - отрицательный результат
 2 «СС» - сыворотка специфическая к возбудителю *C. perfringens*
 3 «СН» - сыворотка нормальная
 4 «AgC» - антиген специфический

Из результатов, приведенных в таблице видно, что наиболее активный антиген возбудителя *C. perfringens* получен по 2 способу, активность данного антигена в РДП составила 1:32, а антиген, приготовленный по 1 способу, в РДП показал активность 1:16.

В дальнейшем в качестве диагностического препарата для создания тест-системы к возбудителю *C. perfringens* будет использован антиген, приготовленный по второму способу.

Выводы

В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные способы очистки и концентрирования возбудителя *C. perfringens* из бактериальной массы.

На основе очищенного препарата был приготовлен активный антиген к возбудителю *C. perfringens* по методу кипячения (соматический антиген), активность которого в РДП составила 1:32.

Литература:

1. Авакян А. А. *C. perfringens* / А. А. Авакян, Л. Н. Кац, И. Б. Павлова //Атлас анатомии бактерий, патогенных для человека и животных. - М.: Медицина, 1972. - С. 139-147.
2. Grass J.E., Gould L.H., Mahon V.E. Эпидемиология болезней пищевого происхождения вспышек, вызванных *C. perfringens*. США, 1998-2010. // Пищевых патогенов и болезней. – 2013. - 10: 131-136.
3. *Grosset E.* - C.R. Soc. Biol., 1935, v. 118, 765 p.
4. Ефанова Л.И. Дифференциация типов *C. perfringens* (А, В, С и Д) иммунофлуоресцентным методом: автореф. ... канд. вет. наук: 16-803. - М., 1971. - 20 с.
5. Матвеев К.И., Быченко Б.Д. Пищевые токсикоинфекции, вызываемые *C. perfringens* // Руководство по микробиол. диагностике инф. болезней. - М., 1973. - С.225-232.
6. Сидоров М.А., Полякова О.А., Евглевская Н.И. и др. Методические рекомендации по изготовлению агглютинирующих ОК-копи сывороток и определению К-антигена у патогенных эшерихий. // М.- 1981.- 10 с.

Рецензент: к.вет.н., доцент Кыдырбаев Ж.К.