Қазақстан Республикасының Бірінші Президенті күніне арналған **«Сейфуллин оқулары – 9:** жоғарғы білім және ғылым дамуындағы жаңа бағыт» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференция материалдары = Материалы Республиканской научно- теоретической конференции **«Сейфуллинские чтения – 9:** новый вектор развития высшего образования и науки**»** посвященная дню Первого Президента Республики Казахстан. – 2013. – Т.1, ч.2 – С. 274-276

# ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕНОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МИКРОСПОРИИ

***Каркенова А.Б.***

Для выявления микроспории в Казахстане отсутствуют диагностические препараты, а традиционные методы, такие как выделение чистой культуры, являются длительными в исполнении и не всегда эффективными. В связи с этим, остро стоит проблема в создании таких методов диагностики, которые позволили бы достоверно выявить наличие возбудителя микроспории на ранней стадии заболевания человека и животных.

Серологическая диагностика болезни, основанная на взаимодействии антигена с антителом, включает такие иммунологические реакции как РА и РП в различных вариантах, иммуноферментный анализ и т.д.

ИФА имеет ряд преимуществ перед другими методами: стабильность реагентов, меченных ферментами, отсутствие контакта с радиоактивными веществами, простота учета результатов реакции. Для постановки ИФА требуется наличие полноценных антигенов, обладающих чистотой и специфичностью.

*Цель данной работы* – получение, очистка и характеристика белковых и полисахаридных антигенов *Microsporum canis* с высокой специфической активностью.

Работа проводилась в рамках проекта «Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей дерматофитий и создание тест-систем для диагностики микроспории, руброфитии и гипсовой трихофитии». В работе использовали культуру гриба *M. canis* штамм №13, выделенную от больной микроспорией кошки; антигены белковые и полисахаридные.

Для получения биомассы проводили глубинное культивирование в течение 15 суток при температуре 28 °С с периодическим перемешиванием. С плотных питательных сред биомассу грибов отделяли от агара с помощью микологической иглы и скальпеля. С жидкой питательной среды биомассу отделяли трехкратным низкоскоростным центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Очистку проводили трехкратным отмыванием сырой мицелиальной массы в физиологическом растворе. Для определения количества биомассы дерматомицета проводили взвешивание. Общий выход биомассы составил 31,44 грамма.

Из биомассы дерматомицетов экстрагировали антиген по методу замораживания-оттаивания (антиген 1) отмыванием от питательной среды дистиллированной водой и просушиванием до воздушно-сухой массы. Затем заливали небольшими порциями азота с перерывами по три раза. Заливали 10%-ым раствором *NaOH* и ставили в низкотемпературный холодильник для

замораживания. Через час отмораживали и ставили в холодильник на ночь. Процедуру повторяли 9 раз. Полученную биомассу очищали низкоскоростным центрифугированием. Надосадочную жидкость (супернатант) сливали и центрифугировали.

Получение антигена полисахаридного (антиген 2) осаждением этиловым спиртом. Двухнедельную культуру грибов фильтровали через бумажный фильтр, центрифугировали промывая трехкратно осадок с помощью нейтрального физиологического раствора. Проводили разрушение клеток мицелия жидким азотом. Добавляли равный объем раствора 1М *NaOH* при постоянном перемешивании в течение 30 минут. Уравновешивали pH до 7,0. Проводили осаждение 96° этиловым спиртом. Осадок отделяли центрифугированием, сушили до сухо-воздушной массы.

Полученные антигены очищали с помощью низкоскоростного центрифугирования, диализа, гель-колоночной хроматографии. В результате хроматографического разделения антигенных препаратов штамма №13 получены две фракции, отличающихся оптической плотностью, причем первая выходит сразу за свободным объёмом колонки, а вторая фракция – через два свободных объема.

Концентрирование антигенов, очищенных диализом и хроматографией, проводили в ПЭГ- 6000. Определение концентрации белка проводили по *Bradford M.M. (1976),* углеводов – пробой Молиша (сернокислым методом). В полученных антигенах определяли концентрацию белка и углеводов Концентрация нативных и очищенных антигенов имела следующие показатели (таблица 1, 2).

Таблица 1. Концентрация белка в антигенах (мг/мл)

| Антиген | Нативный | Очищенный антиген методом | | |
|---|---|---|---|---|
| | | диализа | хроматографией | Концентрированный |
| Антиген 1 | 0,125 | 0,125 | 1 пик – 0,015<br>2 пик – 0,030 | 1 пик – 0,060<br>2 пик – 0,250 |
| Антиген 2 | 0,030 | 0,030 | 1 пик – 0,015<br>2 пик – 0,030 | 1 пик – 0,015<br>2 пик –0,030 |

Таблица 2. Концентрация углеводов в антигенах (мг/мл)

| Антиген | Нативный | Очищенный антиген методом | | |
|---|---|---|---|---|
| | | диализа | хроматографией | Концентрированный |
| Антиген 1 | 0,025 | 0,025 | 1 пик – 0,062<br>2 пик – 0, 031 | 1 пик – 0,015<br>2 пик – 0,031 |
| Антиген 2 | 2,0 | 2,0 | 1 пик – 0,25<br>2 пик – 0,5 | 1 пик – 0,5<br>2 пик – 1,0 |

Для изучения агглютинирующих свойств антигенов проводили реакцию капельной агглютинации на стекле. По окончании реакции хлопьевидного осадка не наблюдали, т.е. результат реакции отрицательный. Это объясняется тем, данный антиген является растворимым, а не корпускулярным.

Преципитирующие свойства антигенов были изучены в РИД. При постановке реакции линии преципитации обнаружено не было, что говорит что антигены не обладают преципитирующими свойствами.

Для изучения активности полученных антигенов проводили непрямой ИФА нативных и очищенных антигенов с сыворотками больных микроспорией кошек. Титр антител в непрямом ИФА варьировал в пределах 1:400 – 1:1600.

Таким образом, нами получены антигены полисахаридный и по замораживанию-оттаиванию. Антигены были очищены низкоскоростным центрифугированием, диализом и хроматографией. В ПЭГ 6000 было проведено концентрирование. Концентрация белков в белковых антигенах варьировала в пределах 0,125 – 0,250 мг/мл, углеводов – 0,015-0,031 мг/мл; концентрация углеводов в полисахаридных антигенах составляла 0,5-2 мг/мл, белков 0,015-0,030 мг/мл. Была изучена активность антигенов в РА, РИД, непрямом ИФА. Агглютинирующих и преципитирующих свойств в исследуемых антигенах обнаружено не было; титр антител в непрямом ИФА составил 1:400 – 1:1600.