

УДК 619:579.842.14:616–097

Л. А. АМОСОВА, Ю. В. ЛОМАКО, Н. В. МОСКАЛЕВА

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ *S. DUBLIN* И *S. TYRNIMURIUM* ПРИ ПОМОЩИ СОЛЯНОКИСЛОГО ГИДРОКСИЛАМИНА И МОЧЕВИНЫ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского

(Поступила в редакцию 07.10.2009)

Известно, что иммунитет у животных можно создать не только при помощи корпускулярных вакцин, но и вакцин, состоящих из части клетки. В числе препаратов, разрабатываемых для профилактики кишечных инфекций, особое место занимают химические вакцины, включающие в качестве антигенного начала комплекс протективных антигенов, изолированных из клеток производственных штаммов соответствующих возбудителей. Возможность индукции иммунного ответа при введении в макроорганизмы только специфических протективных субстанций, максимально освобожденных от сопутствующих балластных компонентов, открывает пути для совершенствования вакцинных препаратов и стандартизации их свойств [1].

Долгое время считали, что антигенная и иммуногенная активность вакцин связана с белковой частью микробной клетки. Однако полноценность антигенных препаратов энтеробактерий определяется содержанием необходимого набора поверхностных протективных антигенов (O, Vi, H). Получение полных антигенов, обладающих высокой иммуногенностью, является важной задачей современной ветеринарной иммунологии.

Исследования по созданию препаратов, включающих отдельные антигенные компоненты бактериальной клетки, начали проводить еще в первой половине XX века. Известны следующие методы получения полных антигенных комплексов:

- 1) методы кислотного и щелочного гидролиза, применения нейтральных экстрагентов (трихлоруксусная, уксусная кислота, этиленгликоль, воднофеноловая смесь);
- 2) извлечение полных антигенов ферментативным расщеплением бактерий;
- 3) физическое воздействие на микробную клетку (замораживание – оттаивание, действие электрического тока, ультразвука) [2].

Некоторые исследователи объединили несколько методов выделения антигенов из бактериальной клетки. Например, Дж. А. Моррис с сотрудниками получали протективные антигены путем постоянного встряхивания бактериальной массы и последующей ее обработкой либо серноокислым аммонием, либо уксусной кислотой [3].

Минимальное повреждение антигенов возможно и при использовании метода А. Н. Головки, заключающегося в обработке бактериальных клеток фосфатно-мочевинным буфером и последующим термошоком при 60 °С [4].

Следует учитывать, что протективные антигены обладают сложной полимерной структурой и в процессе экстракции претерпевают частичную деградацию, что может повлиять на их свойства и отразиться на активности создаваемого иммунитета. Вышеописанные группы методов не позволяют получить препараты с максимально сохраненной антигенной структурой. Жесткие воздействия при обработке химическими веществами приводят к тотальному разрушению кле-

ток и переходу в субстрат значительного количества балластных веществ, при этом так же происходит изменение нативной конформации антигена, что изменяет его свойства. Ферментативные методы позволяют увеличить выход антигена, однако при обязательной очистке значительная его часть утрачивается. Препараты, получаемые физическими методами, малотоксичны, малоиммуногенны и содержат много балластных веществ.

Для получения малотоксичных иммунных препаратов с сохранением антигенной структуры существует щадящий метод обработки бактерий при помощи солянокислого гидроксиламина (СКГА). Согласно данным Ю. М. Беньямина, А. А. Абидова, препарат обеспечивает получение низкотоксичного препарата с высоким содержанием белков [1].

Исследования Ю. Н. Алексеевой показали, что использование гидроксиламина обеспечивает получение протективных О- и Н-антигенов из штамма *S. typhimurium*. Кроме того, в полученном препарате антигены содержались в оптимальном соотношении [5]. Согласно данным Н. Е. Захаровой, обработка *Shigella dysenteriae* СКГА позволяет получить высокоиммуногенный препарат, состоящий из белковых липополисахаридных комплексов и отличающийся низкой токсичностью [6]. Учеными Н. Е. Захаровой, Н. П. Ванеевой, Н. Е. Ястребовой отмечено, что гидроксиламин усиливает О-специфическую активность антигенов. Это происходит в результате дезагрегации липополисахаридных комплексов либо разрушения части белков, нуклеиновых кислот и липидов [7].

Нами изучены щадящие методы экстракции антигенов с использованием солянокислого гидроксиламина и мочевины. Оптимальный способ будет заложен в промышленный регламент по изготовлению вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота.

Цель исследования – разработка щадящего способа получения нетоксичных антигенов сальмонелл при помощи солянокислого гидроксиламина и мочевины.

Материалы и методы исследования. Для получения поверхностных протективных субстанций из штаммов *S. dublin* 373 и *S. typhimurium* 371 (ВГНКИ г. Москва) использовали солянокислый гидроксиламин и мочевины. Экстракцию культур проводили по способу А. Н. Головки. При изготовлении образцов использовали культуры сальмонелл с концентрацией бактериальных клеток 20 и 40 млрд/мл, гидроксиламин в концентрации 0,1, 0,2, 0,3% и 2М раствор мочевины (112 г/л). Для получения нетоксичного для белых мышей образца проводили инактивацию 0,5–1,0%-ным раствором формалина и 0,2%-ным теотропина при температуре 37 °С, время выдержки 24–72 ч. В полученных образцах определяли концентрацию белка микробиуретовым методом и полисахаридов по Дюбуа. Пробы исследовали при помощи спектрофотометра SP 80001 (Metertech), используя калибровочную кривую.

Для определения острой токсичности полученных образцов провели четыре серии опытов на лабораторных животных. Образцы вводили белым мышам массой 14–16 г в количестве 0,3 мл подкожно. Для первой серии опытов сформировали 6 групп животных по пять голов в каждой, животным вводили образцы антигенов *S. dublin* и *S. typhimurium*, полученные при использовании 40 млрд/мл концентрации бактериальных клеток и 0,1, 0,2, 0,3%-ных растворов СКГА. Во второй серии опытов сформировали две группы белых мышей, которым вводили образцы антигенов *S. dublin* и *S. typhimurium* на основе 20 млрд/мл концентрации бактериальных клеток и 0,1%-ного растворов СКГА. Для проведения третьей серии опытов сформировали 16 групп животных. Вводимые образцы были приготовлены с использованием СКГА и 2М мочевины, содержали 0,5, 0,75, 1% формалина и 0,2% теотропина. Четвертую серию опытов по определению острой токсичности образцов проводили на двух группах белых мышей: первой инъецировали антигены *S. dublin*, второй – *S. typhimurium*. Для получения образцов использовали культуру, содержащую 20 млрд/мл микробных клеток, 0,1%-ный раствор СКГА, 0,5% формалина с экспозицией 72 ч при температуре 37 °С. Наблюдение за животными вели в течение 10 дней.

Результаты и их обсуждение. Для получения протективных антигенов использовали метод, разработанный Ю. В. Ломако [8]. Концентрацию бактерий доводили до 40 млрд/мл, в качестве экстрагирующего вещества использовали 0,2%-ный раствор гидроксиламина. Образец оказался стерильным до добавления инактиванта, что подтверждает инактивирующие способности гидроксиламина. Подкожное введение белым мышам образцов как до, так и после детоксикации

формалином приводило к гибели в течение 48 ч, что свидетельствует о токсичности полученных образцов. Отсюда следует, что формалин в концентрации 0,5% не обеспечивает получение безвредного образца из протективных антигенов сальмонелл. Из полученного результата следует, что токсичность может быть обусловлена следующими факторами: экстрагирующим веществом и параметрами получения протективных антигенов; концентрацией экстрагирующего вещества; концентрацией бактериальных клеток; недостаточной детоксикацией.

Согласно данным Ю. В. Ломако, токсическая доза СКГА для белых мышей составляет 1,8 мг, или 0,5 мл 0,36%-ного раствора на животное, поэтому используемый экстрагент даже в концентрации 0,3% и объеме 0,3 мл не может оказать повреждающего действия на организм [8].

Для определения влияния концентрации экстрагирующего вещества на токсичность препарата использовали 0,1%; 0,2% и 0,3%-ный растворы гидроксиламина солянокислого (табл. 1).

Согласно полученным данным, изменения концентрации соляного гидроксиламина от 0,1 до 0,3% повышает выход белка на 20–29% и полисахаридов на 22,4–31,2%.

Т а б л и ц а 1. Выход общего белка и полисахаридов из культур *S. dublin* и *S. typhimurium* в зависимости от концентрации гидроксиламина солянокислого

Экстрагирующее вещество	Культура (концентрация БК – 40 млрд/мл)							
	<i>S. dublin</i>				<i>S. typhimurium</i>			
	Белок, мг/мл	%	ПС, мкг/мл	%	Белок, мг/мл	%	ПС, мкг/мл	%
Гидроксиламин, 0,1%	3,2	71,0	26,0	77,6	2,4	80,0	26,5	68,8
Гидроксиламин, 0,2%	3,6	80,0	25,0	74,6	2,9	96,7	29,5	76,6
Гидроксиламин, 0,3%	4,5	100	33,5	100	3,0	100	38,5	100

Таким образом, выход полученных веществ (белок, полисахариды) напрямую коррелирует с концентрацией СКГА.

Для детоксикации образцов использовали 0,5%-ный раствор формалина с экспозицией 24 ч при температуре 37 °С. Токсичность определяли путем введения 0,3 мл подкожно мышам массой 14–16 г.

Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация солянокислого гидроксиламина влияет на экстракцию веществ, токсичных для организма животного. При использовании 40 млрд взвеси культуры и 0,3%-ного раствора гидроксиламина мыши погибали мгновенно (наблюдались судороги), 0,2%-ного – в течение 24 ч. Введение образцов с использованием 0,1%-ной концентрации вызвало гибель 50–75% животных в течение 24–48 ч.

Причиной токсичности также может быть чрезмерная концентрация бактериальных клеток, подвергаемых экстракции, поэтому нами были приготовлены образцы с использованием концентрации бактериальных клеток 20 млрд/мл, 0,1%-ного раствора гидроксиламина и 0,5%-ного формалина с экспозицией 24 ч при температуре 37 °С.

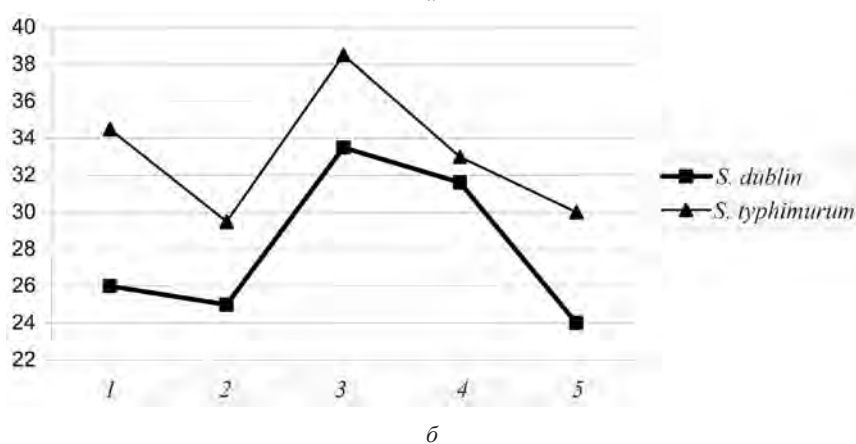
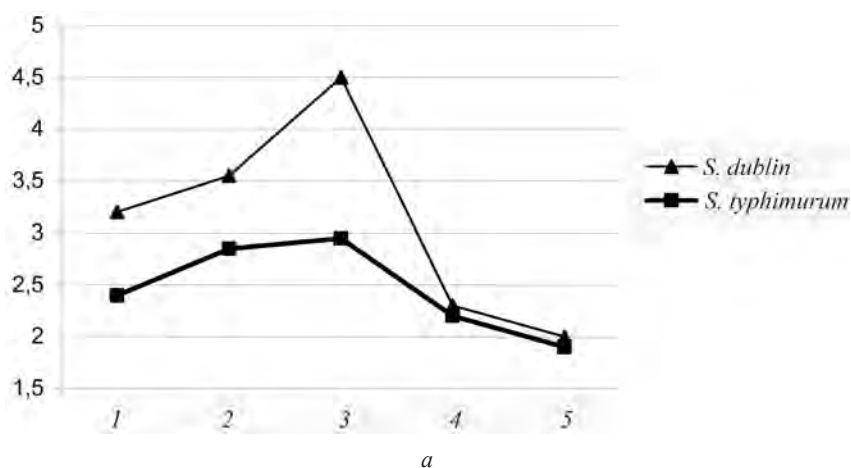
Результаты исследования токсичности белых мышах показали, что реакция на подкожное введение у животных отсутствует, однако на 10–14-й день 70% животных погибло с признаками отечного синдрома.

Итак, при обработке гидроксиламином в значительной мере экстрагируются поверхностные структуры бактериальной клетки, возможно О-антиген (эндотоксин), обладающие токсичностью. Для сравнения экстрагирующей способности действующих веществ использовали 0,1%-ный раствор гидроксиламина и 2М мочевины. В образцах определяли содержание общего белка и полисахаридов (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Выход общего белка и полисахаридов в культурах *S. dublin* и *S. typhimurium* при использовании 0,1%-ного раствора СКГА и 2М мочевины

Экстрагирующее вещество	Культура (концентрация БК – 20 млрд/мл)			
	<i>S. dublin</i>		<i>S. typhimurium</i>	
	Белок, мг/мл	ПС, мкг/мл	Белок, мг/мл	ПС, мкг/мл
Гидроксиламин, 0,1%	2,3±0,3	31,6±6,5*	2,2±0,5	33,3±3,5
2М раствор мочевины	2,0±0,1	24,0	1,9±0,08	30,3±4,6

* $P \leq 0,5$.



Концентрация белка (а) и полисахаридов (б) в образцах протективных антигенов: 1 – 40 млрд/мл + 0,1%-ный раствор солянокислого гидроксиламина, 2 – 40 млрд/мл + 0,2%-ный раствор солянокислого гидроксиламина, 3 – 40 млрд/мл + 0,3%-ный раствор солянокислого гидроксиламина, 4 – 20 млрд/мл + 0,1%-ный раствор солянокислого гидроксиламина, 5 – 20 млрд/мл + 2М раствор мочевины

Сравнительный анализ экстрагирующей способности различных концентраций гидроксиламина, а также 2М мочевины и 0,1%-ного раствора гидроксиламина в зависимости от концентрации бактериальных клеток показал, что, содержание белка и полисахаридов зависит от концентрации солянокислого гидроксиламина в образцах и количества клеток (рисунок). Так, применение 0,3%-ного раствора гидроксиламина по сравнению с 0,1%-ным и 0,2%-ным растворами у *S. dublin* дает больший выход по белку на 29 и 20%, а по полисахаридам – на 22,4 и 25,4% соответственно. Аналогичные результаты были получены и по штамму *S. typhimurium* (см. табл. 1).

Обработка мочевиной приводит к меньшему выходу исследуемых веществ (от 7,6 до 7,8% белка, от 8 до 24% полисахаридов), чем 0,1%-ный СКГА. При снижении концентрации бактериальных клеток до 20 млрд/мл и использовании СКГА в 0,1%-ной концентрации содержание белка у *S. dublin* снизилось на 28,1%, у *S. typhimurium* на 4,4%. Отмечено, что после экстракции у культуры *S. typhimurium* количество полисахаридов больше, а белка меньше по сравнению с культурой *S. dublin*, что возможно из-за различной структуры и количества О- и Н-антигенов бактерий.

Как показали и дальнейшие исследования суммарных антигенов, после уменьшения количества бактериальных клеток до 20 млрд/мл при экстракции 0,1%-ным раствором солянокислого гидроксиламина и 2 М раствором мочевины, животные не заболели, однако наблюдалась их гибель на 10–14-е сутки с явлениями отека синдрома. Следовательно, необходимы дополнительные методы детоксикации препарата, поэтому применяли формалин и теотропин в различных концентрациях, для установления оптимальной.

В дальнейших исследованиях нами были проведены опыты по снижению токсичности антигенов, выделенных из *S. dublin* и *S. typhimurium* с использованием формалина в концентрации 0,5, 0,75, 1,0% и теотропина в 0,2%-ной концентрации в течение 24 ч при температуре 37 °С (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Результаты исследований по снижению токсичности антигенов, выделенных из *S. dublin* и *S. typhimurium* с использованием формалина и теотропина

Экстрагирующее вещество	Концентрация, %		Реакция животных
	формалина	теотропина	
<i>S. dublin</i> , 20 млрд/мл			
0,1%-ный гидроксилламин	0,5	–	Здоровы
	0,75	–	Здоровы
	1,0	–	Здоровы
	–	0,2	Интоксикация в течение 24 ч, через 72 ч выздоровление
2М мочевины	0,5	–	Здоровы
	0,75	–	25% пали на 2-е сутки
	1,0	–	
	–	0,2	50% пали на 10–12-е сутки
<i>S. typhimurium</i> , 20 млрд/мл			
0,1%-ный гидроксилламин	0,5	–	Здоровы
	0,75	–	Здоровы
	1,0	–	Интоксикация в течение 24 ч, через 72 ч выздоровление
	–	0,2	Здоровы
2М мочевины	0,5	–	Здоровы
	0,75	–	Здоровы
	1,0	–	Здоровы
	–	0,2	50% пали на 10–12-е сутки

Четкого влияния формалина в различных концентрациях и теотропина на токсичность образцов не выявлено. Образцы были введены белым мышам на 7-й день после приготовления, так как необходимо время, чтобы токсичность инактиванта (формалина) израсходовалась на обезвреживание субстрата. В полученных результатах отсутствует какая-либо закономерность. Например, образец с 1,0%-ным формалином *S. dublin* + 0,1%-ный гидроксилламин не вызывал патологической реакции со стороны животных, а при введении образца с *S. typhimurium* отмечалась интоксикация. В случае с образцом *S. dublin* + 2М мочевины все мыши остались живы только при использовании 0,5%-ного формалина, в остальных случаях погибало 25–50% животных. В образцах *S. typhimurium* + 2М мочевины токсичным оказался тот, в котором использовали 0,2%-ный теотропин.

На основании полученных результатов в дальнейшем было принято решение использовать для дополнительной инактивации 0,4–0,5%-ный формалин.

Чтобы определить влияние параметров инактивации формалином (температура и время выдержки) на токсичность образцов, их поместили на 72 ч в термостат при 37 °С. После введения препаратов животным вели наблюдение 30 дней. Признаков интоксикации не выявлено, все мыши остались живы. При использовании образцов (20-миллиардная культура и 0,1%-ная концентрация гидроксиламина солянокислого) без добавления формалина, у мышей на 2–3-е сутки регистрировали слабость, склеенность глазной щели.

Выводы

1. Концентрация солянокислого гидроксиламина влияет на выход полисахаридных и белковых субстанций сальмонелл. Так, применение 0,3%-ного раствора гидроксиламина по сравнению с 0,1%-ным и 0,2%-ным растворами дает больший выход по белку на 4,3–29%, а по полисахаридам – на 22,4–31,2%.

2. Обработка раствором 2М мочевины приводит к меньшему выходу исследуемых веществ белка (7,6–7,8%) и полисахаридов (8–24%) по сравнению с использованием 0,1%-ного СКГА.

3. Токсичность образцов зависит от концентраций бактериальных клеток и СКГА. Тотальную гибель мышей вызвал образец, состоящий из 0,3%-ного СКГА и 40 млрд/мл концентрации бак-

териальных клеток. Изменение концентраций до 0,1% и 20 млрд/мл соответственно позволило получить наименее токсичный образец протективных антигенов сальмонелл.

4. Устранение токсичности образцов протективных антигенов возможно при дополнительной обработке образцов формалином с экспозицией 72 ч при температуре 37 °С.

5. Предварительные исследования позволили определить, что нетоксичный образец протективных поверхностных сальмонеллезных антигенов возможно получить, используя 20-миллиардную культуру, 0,1%-ный раствор гидроксиламина, 0,4–0,5%-ный формалин при экспозиции 72 ч (37 °С).

Литература

1. Карпухин, Г. И. Химические вакцины для профилактики кишечных инфекций / Г. И. Карпухин, Н. И. Шапиро, Р. А. Андриевская. – Л.: Медицина, 1979. – 192 с.
2. Петросян, Е. А. Комплексные антигены тифо-паратифозной группы бактерий / Е. А. Петросян. – М.: Медгиз, 1961. – 227 с.
3. Morris, J. A. Preliminary characterization of cell-free antigen isolated from *E. coli* B4 / J. A. Morris, C. J. Thorns, W. J. Sojka // *J. Gen. Microbiol.* – 1977. – Vol. 99. – P. 353–357.
4. Головкин, А. Н. Способы диагностики и специфической профилактики колибактериоза телят на основе факторов патогенности возбудителя: дис. д-ра ... вет. наук: 16.00.03 / А. Н. Головкин; Харьковская с.-х. ветеринарная академия. – Харьков, 1996. – 272 л.
5. Алексеева, Н. Ю. Конструирование вакцин нового поколения против сальмонеллез и чумы на основе структурного объединения антигенов и синтетических полиэлектролитов: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 14.00.36 / Н. Ю. Алексеева; Московская ветеринарная академия. – М., 1997. – 48 с.
6. Захарова, Н. Е. Влияние обработки солянокислым гидроксиламином на жирнокислотный состав липополисахаридов *Shigella dysenteriae* / Н. Е. Захарова, В. Л. Львов, Н. П. Ванеева // *ЖМЭИ.* – 2000. – № 6. – С. 25–27.
7. Влияние солянокислого гидроксиламина на бактерии *Shigella dysenteriae* 1 и антигены, выделенные из них / Н. Е. Захарова [и др.] // *ЖМЭИ.* – 1998. – № 6. – С. 82–83.
8. Ломачко, Ю. В. Специфическая профилактика колибактериоза телят на основе адгезивных антигенов возбудителя: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Ю. В. Ломачко; Институт экспериментальной ветеринарии. – Минск, 2003. – 142 л.

L. A. AMOSOVA, J. V. LOMAKO, N. V. MOSKALEVA

DEVELOPING A WAY OF OBTAINING SUPERFICIAL PROTECTIVE ANTIGENES *S. DUBLIN* AND *S. TYPHIMURIUM* BY MEANS OF MURIATIC ACID HYDROXYLAMINE AND UREA FOR PREPARATION OF VACCINE COMPONENTS AGAINST THE SALMONELLOSIS OF CATTLE

Summary

The article considers the ways of obtaining protective antigenes *S. dublin* and *S. typhimurium* with the help of hydroxylamine muriatic acid and urea. The selection of various concentration extractive substances, bacterial cages, inactivating agent allowed obtaining a non-toxic sample for further immunization of animals.