

УДК 619:615.371:616.98:579.842.14

А. П. ЛЕМИШ, Л. А. АМОСОВА, А. С. АНДРУСЕВИЧ

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОГО СОСТАВА ВОЗБУДИТЕЛЯ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ МЕТОДОМ ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского

(Поступила в редакцию 08.06.2010)

Одним из наиболее распространенных бактериальных заболеваний как во всем мире, так и в Беларуси является сальмонеллез, поражающий в основном молодняк животных, однако, возбудители способны вызывать токсикоинфекцию у человека, что делает проблему более острой.

Сальмонеллы подразделяются на серотипы, каждый из которых имеет характерный только для него набор определенных О- и Н-антигенов. Состав антигенов, определяющий антигенную формулу сальмонелл, не является стабильным, поскольку благодаря появлению различных Н- и О-вариаций могут возникать закономерные изменения антигенной структуры, приводящие к появлению новых серотипов [1–4].

Кроме того, имеются данные о вариабельности О-антигена, заключающиеся в его количественном изменении. Чаще всего это происходит с антигенами 1, 6 и 12. Известно, что наличие или отсутствие О-антигена 1 определяется конвертирующим фагом, ответственным за лизогенизацию. Эта вариация возможна в серологических группах А, В и D, которым присущ О-антиген 1, при этом утрата лизогенности ведет к исчезновению этого антигена [1, 5].

Именно О-антиген, представляющий собой фосфолипидо-полисахаридный комплекс, является действующим началом биопрепаратов для профилактики сальмонеллеза. Так, при изготовлении рибосомальной вакцины из штамма *Salm. typhimurium*, дефектного по признаку образования О-антигена, получали малоиммуногенные или не иммуногенные для мышей препараты [6, с. 194–195]. То же справедливо и для рибосомальных вакцин, изготовленных из шероховатых R-штаммов сальмонелл, которые не способны к образованию полной молекулы О-антигена. Показана типоспецифичность иммунного ответа на рибосомальные сальмонеллезные вакцины, что свидетельствует о ведущей роли специфической детерминанты О-антигена [7].

Структура О-антигена может изменяться не только в результате изменчивости бактерий, но и при действии химических факторов, в частности инактиваторов. Общепринятым методом инактивации сальмонелл, используемым в приготовлении многих вакцинных препаратов, является формалин в конечной концентрации 0,5% к объему [8]. Однако формалин, как и фенол, разрушает О-антигенную детерминанту, что проявляется в подавлении агглютинации микроорганизма О-антисывороткой [1, 2]. Существуют данные, утверждающие наличие формалинустойчивых токсинов сальмонелл. Это требует увеличения времени инактивации от 7 до 25 сут, что может быть причиной значительного повреждения О-антигена, и в значительной степени усложняет технологию приготовления вакцин [9].

К одним из широко распространенных методов качественного анализа антигенов относится иммуноэлектрофорез. Применение метода в значительной степени расширило возможности изучения сальмонелл и позволило дать не только иммунологическую, но и физико-химическую характеристику их антигенов. В изучении антигенного состава возбудителей сальмонеллеза и их антигенной принадлежности значительную роль играют диагностические гипериммунные сыворотки. Располагая соответствующими преципитирующими антисыворотками, при помощи иммуноэлектрофореза можно исследовать любую антигенную смесь, в частности антигены

бактерий [10]. Также немаловажное значение в изучении сальмонеллезных антигенов имеют методы их получения и инактивации, обеспечивающие минимальную денатурацию и изменение антигенной структуры их активных центров.

Цель исследования – изучение иммунологического родства возбудителей сальмонеллеза крупного рогатого скота и свиней методом иммуноэлектрофореза.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили в 2009 г. в Институте экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского. Кроликов гипериммунизировали путем 5–7 кратного подкожного введения эмульгированного антигена в дозе 5–10 мг белка на 1 кг массы тела с интервалом 7 дней. В процессе проведения исследований были получены кроличьи гипериммунные сыворотки к антигенам одного сероварианта сальмонелл *Salmonella choleraesuis* (КМИЕВ-В126) РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского».

Антигены серовариантов сальмонелл *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium* получали путем ультразвуковой дезинтеграции (УЗДН) суточных агаровых культур, трехкратно отмытых стерильным физиологическим раствором на установке *Bandelin sonopuls* в течение 15 мин при мощности звукового потока 35кГц. Концентрация микробных клеток до дезинтеграции составляла 10 млрд/см³. УЗДН центрифугировали при 16000 об/мин в течение 10 мин для получения водных экстрактов антигенов. Кроме того, ресуспензировали осадок бактериальных клеток стерильным физиологическим раствором с добавлением детергента *Triton X-100* в конечной концентрации 0,1% от объема и экспозицией 10 мин, снова центрифугировали при аналогичных параметрах. Концентрацию белка в полученных экстрактах определяли по Бредфорд.

В реакции иммунодиффузии (РИД) исследовали гипериммунные сыворотки, полученные в результате иммунизации кроликов антигенами *Salm.choleraesuis* с антигенами *Salm. choleraesuis*, *Salm. dublin* и *Salm. typhimurium*.

Для проведения иммуноэлектрофореза использовали кроличьи гипериммунные сыворотки к антигенам *Salm. choleraesuis* и антигены, представленные УЗДН *Salm. choleraesuis*, *Salm. dublin*, *Salm. typhimurium*. Постановку осуществляли по общепринятым методикам [9].

Результаты и их обсуждение. Концентрация белка водных и обработанных детергентом экстрактов антигенов сальмонелл, а также их соотношение представлено в таблице.

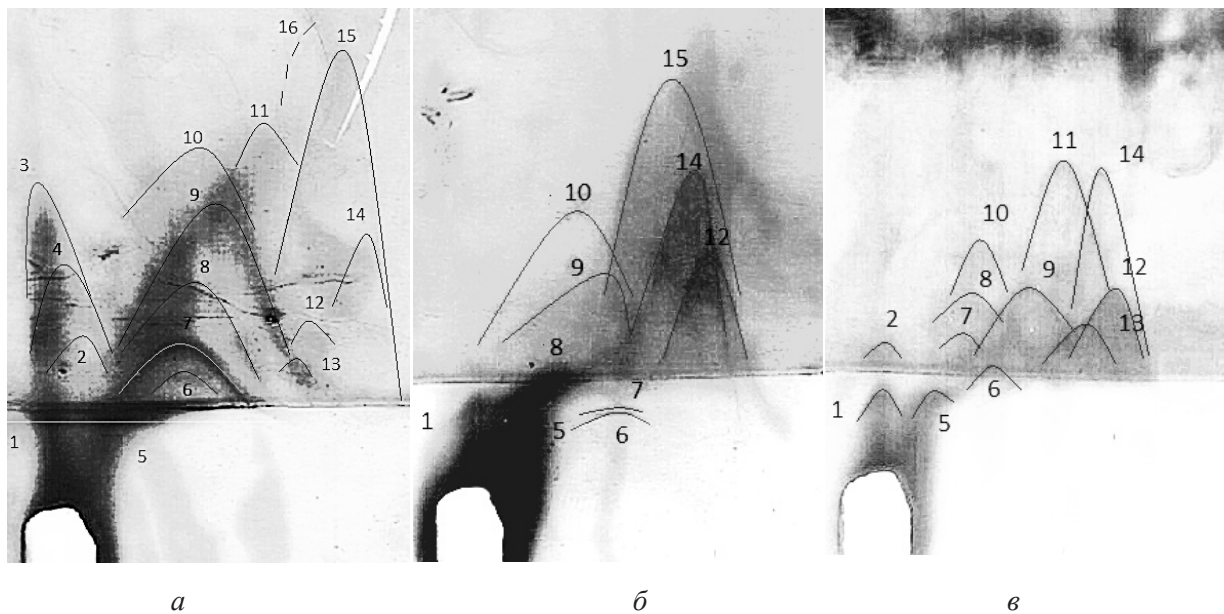
Концентрация белка в водных и обработанных детергентом экстрактах антигенов сальмонелл

| Серотип сальмонелл | Концентрация белка, мг/мл | | Соотношение H ₂ O/Triton X-100 |
|---------------------------|---|------------------------|--|
| | водный экстракт антигена (H ₂ O) | обработка Triton X-100 | |
| <i>Salm. choleraesuis</i> | 1,52 | 1,35 | 1,12 |
| <i>Salm. dublin</i> | 1,40 | 1,29 | 1,08 |
| <i>Salm. typhimurium</i> | 1,57 | 1,59 | 0,99 |

Согласно полученным результатам, *Triton X-100* является хорошим детергентом, позволяющим максимально увеличить число, а также выход растворимых компонентов мембран, не выделяемых без соответствующей обработки, поэтому в работе использовали смесь 50:50 водных экстрактов антигена и экстрактов с присутствием детергента *Triton X-100*.

Исследование гипериммунных сывороток в РИД позволяет выявить общеродовые и групповые антигены у различных серовариантов сальмонелл. В гомологичной системе *Salm. choleraesuis* vs *Salm. choleraesuis* имелось 8 линий преципитации. В гетерологичных системах *Salm. dublin* vs *Salm. choleraesuis* и *Salm. typhimurium* vs *Salm. choleraesuis* получено 7 и 6 линий преципитации соответственно, что свидетельствует о наличии перекрестных реакций.

Дальнейшее изучение антигенного состава серовариантов *Salm. choleraesuis*, *Salm. dublin*, *Salm. typhimurium* проводили путем постановки перекрестного иммуноэлектрофореза (ПИЭФ), куда включали исследуемый антиген и референс-сыворотку, полученную на протективные антигены *Salmonella choleraesuis*.



Перекрестный иммуноэлектрофорез: а – а. с. *Salm. choleraesuis* и Аг *Salm. choleraesuis*, б – Аг *Salm. dublin*, в – Аг *Salm. typhimurium*

На рисунке видно, что антигены всех исследуемых серовариантов сальмонелл образуют специфические линии преципитации с антисывороткой *Salm. choleraesuis*. Наибольшее количество преципитатов (15–16 линий) (рисунок, а) с референс-сывороткой образовали антигены, полученные из сероварианта *Salm. choleraesuis*. Меньшее количество (10–12 линий) преципитатов образовали антигены серовариантов *Salm. dublin*, *Salm. typhimurium* (рисунок, б, в).

Нумерация пиков антигенов осуществлена преимущественно по принципу возрастания электрофоретической подвижности, которая указывает на схожесть гетерологичных систем (рисунок, б, в) с гомологичной, представленной на рисунке, а. Необходимо также отметить и некоторые различия антигенной физико-химической структуры белков возбудителей, что проявляется в виде различной высоты образовавшихся в геле преципитатов. Однако их формирование свидетельствует об антигенном родстве между собой на 66–75%.

Антигены *Salm. choleraesuis* в гомологичной системе образовали наибольшее число линий преципитации. Антигены № 1 и № 5 (рисунок, а) обладают наибольшей молекулярной массой, так как от лунки продвинулись на незначительно расстояние. Возможно, это остатки клеточных стенок бактерий. Антигены № 2–4, также обладают значительной молекулярной массой, но в отличие от антигенов № 1 и № 5 для них характерна более выраженная электрофоретическая подвижность, а значит, данные антигены иммунологически более значимы. Все остальные антигены № 6–15 расположились в геле по убыванию в зависимости от своей структуры и молекулярной массы. Антиген № 16 представлен слабозаметной прерывистой линией ввиду предела чувствительности метода, так как суперантигены не образуют различимых преципитатов и их иммунологическая роль до конца не изучена.

Отсутствие иммунологически различимых преципитатов № 2–4, у антигенов *Salm. dublin* и *Salm. typhimurium* свидетельствует о значительном отличии от антигенов *Salm. choleraesuis* по высокомолекулярным белкам.

Вывод

1. Антигены *Salm. choleraesuis* хорошо распознаются организмом кролика и формируют сильный иммунный ответ.

2. Для выявления общевидовых антигенов возбудителей сальмонеллезом нами был использован метод перекрестного иммуноэлектрофореза, позволяющий регистрировать перекрестно реагирующие компоненты антигенов *Salm. choleraesuis*, *Salm. dublin*, *Salm. typhimurium*.

3. Различие в электрофоретической подвижности белков серовариантов *Salm. choleraesuis*, *Salm. dublin*, *Salm. typhimurium* является доказательством неидентичности антигенов. Формирование преципитатов в гетерологичных системах свидетельствует об антигенном родстве между собой на 66–75%.

Литература

1. П а к , С. Г. Сальмонеллез / С. Г. Пак, М. Х. Турьянов, М. А. Пальцев – М.: Медицина, 1988. – 304 с.
2. Б л ю г е р , А. Ф. Сальмонеллез / А. Ф. Блюгер, И. Н. Новицкий, З. Ф. Тербкова. – Рига: Зинатне, 1975. – 330 с.
3. Т а б а е в а , А. А. Вопросы таксономии и номенклатуры бактерий рода *Salmonella* / А. А. Табаева, А. Л. Котова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – № 6. – С. 110–114.
4. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / Р. Беркли [и др.] ; ред. Д. Хоулт [и др.] ; пер. с англ. Г. А. Заварзина. – 9-е изд. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.
5. E d w a r d s , P. R. Identification of Enterobacteriaceae / P. R. Edwards, W. H. Ewing. – 3-d ed. – Minneapolis: Burges Publishing Co., 1972. – 357 p.
6. Л я ш е н к о , В. А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов / В. А. Ляшенко, А. А. Воробьев. – М.: Медицина, 1982. – 272 p.
7. E i s e n s t e i n , Т. К. Comparative efficacy and toxicity of a ribosomal vaccine, acetone-killed cells, lipopolysaccharide, and a live cell vaccine prepared from *Salmonella typhimurium* / Т. К. Eisenstein, С. R. Angerman // Infect. Immun. – 1978. – Vol. 19(2). – P. 575–582.
8. М е д у н и ц ы н , Н. В. Вакцинология / Н. В. Медуницын. – М.: Триада-Х, 1999. – 276 с.
9. Д а р о в с к и х , С. В. Поливалентная антитоксическая сыворотка против сальмонеллеза животных (получение, контроль и применение): дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / С. В. Даровских; ВГАВМ. – Витебск, 2009. – 24 л.
10. Иммунологические методы / под ред. Г. Фриммеля; пер. с нем. А. П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 476 с.

A. P. LEMISH, L. A. AMOSOVA, A. S. ANDRUSEVITCH

STUDY OF THE ANTIGEN STRUCTURE OF A SALMONELLOSIS ACTIVATOR OF CATTLE AND PIGS

Summary

The paper deals with the data on studying the immunological relationship of antigens of an activator of salmonellosis of cattle and pigs. Identifying activators of salmonellosis of general species is of great value in the development of high immunogenic, areactogenic, specific vaccinal biological products.