

УДК 619:615.36.361.366.15.38

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛИПОПЛИСАХАРИДОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБОВ ВЫДЕЛЕНИЯ**

Красочко П.А., Машеро В.А., Гласкович А.А.  
БелНИИЭВ им. С.Н.Вышелесского, г. Минск

В последние годы вопросу изучения бактериальных липополисахаридов (ЛПС) исследователями уделяется большое внимание. Это обусловлено тем, что они являются поликлональными активаторами В-системы лимфоцитов, т.е. происходит активизация этой субпопуляции как *in vivo*, так и *in vitro*. Даже незначительные дозы ЛПС позволяют активизировать биосинтез антител, повышать функциональную активность лимфоцитов. Часто бактериальные ЛПС используются с целью повышения резистентности или стимуляции поствакцинального иммунитета у животных. Однако при выделении ЛПС из условно-патогенных бактерий - сальмонелл, кишечной палочки, синегнойной палочки, шигелл, после обработки животных часто отмечаются осложнения - отек легких, тахикардия, угнетение общего состояния.

Снижение реактогенности бактериальных ЛПС для животных достигается путем использования в качестве их источника бактерий, непатогенных для теплокровных животных. Такими бактериями могут служить бактерии, выделяемые из насекомых, в частности - возбудители заболеваний пчел.

Целью настоящего исследования явилось отработка оптимального способа выделения бактериального ЛПС из возбудителя европейского гнильца пчел - *Vas.alvei* и оценка иммунологической активности выделенных липополисахаридов.

Накопление бактериальной массы осуществляли на мясо-пептонном агаре путем культивирования при 37 °С в течение 2-х суток. Полученную бактериальную массу смывали стерильным изотоническим раствором натрия хлорида. Получение бактериальных ЛПС осуществляли с помощью гидролиза трихлоруксусной кислотой по Буавену-Месробенау, дистиллированной водой, уксусной кислотой, гидроокисью натрия, гидрокарбонатом натрия.

Иммунологическую оценку бактериальных ЛПС, выделенных различными способами, проводили с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) по включению  $H^3$  тимидина при синтезе ДНК. При этом использованы различные разведения полисахаридов - 10,0 мкг/мл; 20,0 мкг/мл; 30,0 мкг/мл; 40,0 мкг/мл; 50,0 мкг/мл; 100,0 мкг/мл; 200,0 мкг/мл; 400,0 мкг/мл. В качестве контроля использованы общеизвестные митогены - липополисахариды из *E.coli* и *Bact.prodigiousum*. Отношение числа импульсов в минуту в пробе с митогеном к таковому в контроле без митогена принимали за индекс стимуляции.

В результаты проведенных исследований установлено, что при использовании 5,0 г сырой бактериальной массы *Vac.alvei* для получения ЛПС получено: с помощью трихлоруксусной кислоты - 29 мг конечного продукта, уксусной кислоты - 125 мг, гидроокиси натрия - 520 мг, гидрокарбоната натрия - 260 мг, дистиллированной воды - 150 мг. Однако иммунологическая оценка полученных препаратов при постановке РБТЛ оказалась различной. Индекс стимуляции при использовании бактериального ЛПС, полученного при помощи трихлоруксусной кислоты в концентрации 10 мкг/мл был  $2,3 \pm 0,08$ ; 50 мкг/мл - соответственно  $4,44 \pm 0,14$ ; 100 мкг/мл -  $1,59 \pm 0,14$ ; 200 мкг/мл -  $1,31 \pm 0,07$ ; 400 мкг/мл -  $1,08 \pm 0,11$ .

Индекс стимуляции ЛПС, полученного с помощью уксусной кислоты составлял: 10 мкг/мл -  $2,49 \pm 0,08$ ; 50 мкг/мл -  $1,69 \pm 0,58$ ; 100 мкг/мл -  $4,46 \pm 0,07$ ; 200 мкг/мл -  $2,45 \pm 0,04$ ; 400 мкг/мл -  $1,25 \pm 0,11$ .

Активность ЛПС, полученного с помощью гидроокиси натрия была: 10 мкг/мл -  $2,41 \pm 0,09$ ; 50 мкг/мл -  $3,78 \pm 0,88$ ; 100 мкг/мл -  $4,22 \pm 0,13$ ; 200 мкг/мл -  $2,01 \pm 0,07$ ; 400 мкг/мл -  $1,35 \pm 0,19$ .

ЛПС, полученный с помощью гидрокарбоната натрия активизировал лимфоциты следующим образом: 10 мкг/мл -  $1,50 \pm 0,09$ ; 50 мкг/мл -  $1,79 \pm 0,06$ ; 100 мкг/мл -  $2,29 \pm 0,08$ ; 200 мкг/мл -  $1,33 \pm 0,03$ ; 400 мкг/мл -  $1,17 \pm 0,04$ .

Использование дистиллированной воды позволило получить ЛПС со следующей активностью: 10 мкг/мл -  $1,31 \pm 0,09$ ; 50 мкг/мл -  $2,18 \pm 0,43$ ; 100 мкг/мл -  $1,86 \pm 0,31$ ; 200 мкг/мл -  $1,23 \pm 0,02$ ; 400 мкг/мл -  $1,09 \pm 0,15$ .

При постановке РБТЛ с контрольными митогенами установлено, что индекс стимуляции с ЛПС из *E.coli* при концентрации 40 мкг/мл  $4,7 \pm 0,75$ ; 50 мкг/мл -  $9,31 \pm 0,96$ ; 100 мкг/мл -  $10,36 \pm 0,86$ ; 200 мкг/мл -  $3,01 \pm 4,03$ .

ЛПС из *Bact.prodigiousum* имел следующую активность: при концентрации 40 мкг/мл  $3,08 \pm 0,83$ ; 50 мкг/мл -  $16,31 \pm 4,76$ ; 100 мкг/мл -  $21,52 \pm 3,6$ ; 200 мкг/мл -  $4,31 \pm 0,05$ .

В результате проведенных исследований установлено, что наибольший выход бактериального ЛПС получен при использовании щелочного гидролиза гидроокиси натрия, а наименьший выход - при кислотном гидролизе трихлоруксусной кислоты, но иммунологическая активность у изучаемых ЛПС была более высокой при получении с помощью уксусной кислоты. Однако конечный выход липополисахарида, получаемого с помощью уксусной кислоты в 4 раза меньше, чем при использовании гидро-

окиси натрия, хотя иммунологическая активность полученных препаратов была практически одинакова.

УДК

## ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ ХЛАМИДИЙНОГО АНТИГЕНА ПРИ ПОСТАНОВКЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Лысенко А.П., Трубецкая Е.В.  
БелНИИЭВ им. С.Н.Вышелесского, г. Минск

Хламидиоз крупного рогатого скота в настоящее время приобрел особую актуальность и его изучению придается большое значение. Это обусловлено тем, что данная инфекция имеет широкое распространение в различных странах мира. Данное заболевание наносит не только значительный ущерб животноводству, но может быть источником заболевания человека.

Хламидиоз широко распространен в природе. Отсутствие строгой видоспецифичности хламидий определяет многочисленные источники и пути распространения этой инфекции. Хламидии поражают практически все органы и системы организма, вызывая различные по патогенезу и клиническому проявлению заболевания.

У крупного рогатого скота хламидиоз проявляется с различными клиническими признаками - в виде энтеритов, маститов, пневмоний, артритов, эндометритов и т.д.

Проводимые ветеринарными лабораториями диагностические исследования на хламидиоз сельскохозяйственных животных показывают его широкое распространение в животноводческих хозяйствах Беларуси.

В настоящее время диагностическими ветеринарными лабораториями для выявления антител к возбудителю хламидиоза используется реакция связывания комплемента. Но основным недостатком данной реакции является ее низкая чувствительность, длительность постановки и громоздкость. Кроме того, в соответствии с "Инструкцией по диагностике хламидиоза", только по серологическому исследованию диагноз поставить невозможно. Для его постановки необходимо выделение возбудителя хламидиоза или обнаружение хламидиозного антигена в пораженных органах и тканях.

Из имеющихся в настоящее время методов диагностики иммуноферментный анализ является наиболее высокочувствительным, специфичным и дешевым методом.

Целью настоящего исследования является отработка очистки хламидийного антигена для конструирования тест-системы при постановке иммуноферментного анализа для выявления антител в сыворотках крови, носовых секретах, молозиве и молоке.