

УДК 619:579.842.14:616-097

ОТРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ САЛЬМОНЕЛЛ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СОЛЯНОКИСЛОГО ГИДРОКСИЛАМИНА

Амосова Л.А., Ломако Ю.В.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,
г. Минск, Республика Беларусь

Обработка бактерий солянокислым гидроксиламином для получения поверхностных протективных антигенов относится к щадящим методам. Основные иммунологические свойства антигенов определяются белками и полисахаридами. В статье изучено влияние экспозиции, скорости центрифугирования, температурного шока на выход данных веществ. Показано, что дополнительная температурная обработка снижает антигенность, но, возможно, повышает специфичность антигенов.

Processing of bacteria with muriatic hydroxylamine for receiving of superficial protective antigens concerns to sparing methods. The main immunological properties of antigens are defined by proteins and polysaccharides. The influence of an exposition, speed of centrifugation and a temperature shock on the concentration of investigated substances is studied in the article. It is shown, that additional temperature processing reduces antigenicity, but, probably, raises specificity of antigens.

Введение. В Республике Беларусь для профилактики сальмонеллеза применяют цельноклеточные вакцины. Используемые препараты не обеспечивают создание надежного иммунитета, а также запускают ряд осложнений. В такой вакцине содержатся компоненты, способные не только индуцировать специфический иммунный ответ, но и обуславливающие их реактогенность. Иммунизация цельными бактериями приводит к сенсibilизации организма «балластными» внутриклеточными белками. Поэтому вопрос о создании препаратов, освобожденных от антигенореактивных субстанций, не имеющих отношения к формированию специфической защиты, является весьма актуальным в условиях современного животноводства [2].

Сальмонеллы обладают О- и Н-антигенами (некоторые содержат Vi-антиген), индуцирующими формирование специфической защиты. Ранее считалось, что для создания иммунитета против сальмонеллеза, достаточно наличия в вакцинном препарате только соматических О-антигенов. Однако, как следует из данных литературы, в формировании антиинфекционного иммунитета важное значение имеют не только О-, но и Н-антигены [2, 4, 5].

О-антиген является тимуснезависимым антигеном, на него развивается ответ по клеточному типу. В свою очередь Н-антиген способен индуцировать иммунный ответ, как по клеточному, так и по гуморальному типу [1]. Еще в начале 60-х годов в эпидемиологических опытах было показано, что Н-антиген сальмонелл тифа обладает высокой защитной активностью и присутствие его в брюшнотифозных вакцинах, делает ее более эффективной. При этом большую роль в этом играет сохранение нормальной конфигурации макромолекулы белкового компонента жгутиков – флагелина, которая легко разрушается под действием кислотности среды (рН ниже 4 или выше 11), повышенных температур и прочих неблагоприятных факторов. Таким образом, сохранение структурных компонентов сальмонелл (жгутиков, оболочек) необходимо для синтеза иммуноглобулинов различных классов IgG и IgM, которые способствуют формированию полноценного и напряженного иммунитета [4, 5].

Работы по созданию препаратов, включающих отдельные антигенные компоненты бактериальной клетки, начались еще в первой половине 20-го века. Известны химические, физические и ферментативные методы получения полных антигенных комплексов. Однако они не позволяют получить препараты с максимально сохраненной антигенной структурой. Для получения малотоксичных иммунных препаратов с сохранением антигенной структуры существует щадящий метод обработки бактерий при помощи солянокислого гидроксиламина [3].

Цель исследования – изучить влияние различных параметров (экспозиция, скорость осаждения, температурный шок) на выход и антигенную активность антигенов *S. typhimurium*, полученных при помощи солянокислого гидроксиламина.

Материалы и методы. Для приготовления антигенов использовали штамм *Sal. typhimurium* КМИЭВ – В 128. За основу взята методика получения адгезивных антигенов *E.coli* Ю.В. Ломако [6]. Приготовлено девять образцов антигенов с различной комбинацией исследуемых параметров: экспозиция с солянокислым гидроксиламином (24 и 48 ч), скорость центрифугирования при осаждении бактериальных клеток 5 и 10 тыс. об/мин, что соответствовало 5500 и 24000 g, наличие либо отсутствие температурного шока. В полученных образцах измеряли содержание полисахаридов по Дюбуа и белка по Лоури. Для изучения антигенности сформированы одна контрольная и восемь опытных групп белых мышей самцов массой 16-18 г, по 4 головы в каждой. Образцы антигенов инъецировали животным опытных групп в объеме 0,3 см³ подкожно, на 10-ый день животных обескровливали, измеряли титры специфических антител в полученных сыворотках крови при помощи РНГА.

Результаты и их обсуждение. Гидроксиламиновые антигены *Sal. typhimurium* получали путем модификации методики, предложенной Ю.В. Ломако. Учитывали влияние экспозиции, скорости осаждения бактериальных клеток, температурного шока на иммунобиохимические свойства антигенов.

Изучение влияния экспозиции показало, что выход белков и полисахаридов при 24-часовой экспозиции больше на 3,7-4,2%. Возможно при более длительной выдержке разрушаются компоненты бактериальной клетки, представленные исследуемыми веществами, что и объясняет их меньшую концентрацию (табл. 1).

Таблица 1- Влияние различных параметров на выход белковых и полисахаридных субстанций антигенов *Sal. typhimurium*, полученных при помощи солянокислого гидроксилamina

Параметры	Белок, мг/см ³	Полисахариды, мкг/см ³
Экспозиция		
24 часа	2,22±0,27*	28,0±3,7
48 часов	2,13±0,01	27,0±3,2
Скорость центрифугирования		
5500 g	2,24±0,25	27,25±3,6
24000 g	2,14±0,12*	26,25±3,2
Температурный шок		
60 °C	2,09±0,05*	30,25±1,7
без обработки	2,3±0,23*	24,75±1,0

Примечание *P≤0,01

Разница выхода белков и полисахаридов при скорости вращения ротора центрифуги 5500 и 24000 g составляет 3,8-4,7%. Выход исследуемых веществ при 5500 g больше, что может быть объяснено недостаточным осаждением компонентов бактериальной клетки, а значит наличием в исследуемых образцах балластных белков и полисахаридов. При скорости 24000 g получен более чистый препарат, так как клетки остаются в осадке, а декант получается прозрачным, соломенного цвета.

Значительное влияние на концентрацию белков и полисахаридов оказывает температурный шок. Выход белков при его наличии меньше на 9,1%, полисахаридов больше на 22,2%. Известно, что полисахаридная часть антигена определяет специфичность, а белковая повышает антигенность. В данном случае более важным является создание специфичного иммунитета, поэтому использование температурного шока рекомендовано при получении гидроксиламиновых антигенов сальмонелл.

Таблица 2 - Влияние параметров экстракции антигенов *Sal. typhimurium* на антигенность полученных образцов

Образец	24 ч, 5500g, т.ш.	24 ч, 5500g	24 ч, 24000g, т.ш.	24 ч, 24000g	48 ч, 5500g, т.ш.	48 ч, 5500g	48 ч, 24000g, т.ш.	48 ч, 24000g	контроль
Титр антител, log ₂	3,7±0,6	5,0±1,0	4,3±0,6	4,0	4,7±0,6	5,7±0,6	5,3±0,6	4,3±0,6	1,7±0,6

Согласно результатам, отраженным в таблице 2, однократное введение антигенов приводит к формированию титров специфических антител в сыворотке крови мышей 3,7-5,7 log₂ в РНГА. Средний титр антител, полученный в результате иммунизации образцами, подвергнутыми температурной обработке составил 4,5 log₂, остальными – 5,0 log₂. Полученные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым увеличение концентрации белков в препарате, повышает его антигенность.

Выводы: 1. Рекомендуемая экспозиция бактериальной клетки *Sal. typhimurium* с СКГА составляет 24 ч, что обеспечивает больший выход белков и полисахаридов на 3,7 и 4,2% соответственно. 2. Рекомендуемая скорость центрифугирования суспензии бактериальных клеток при получении поверхностных антигенов – 24000 g, так как она обеспечивает полное осаждение клеток. 3. Температурный шок приводит к меньшему выходу белка (9,1%), что понижает антигенность образцов. Можно предположить, что специфичность в данном случае будет выше за счет большей концентрации полисахаридов (2,2%), поэтому использование температурного шока рекомендовано при получении гидроксиламиновых антигенов сальмонелл.

Литература. 1. Алексеева, Н.Ю. Конструирование вакцин нового поколения против сальмонеллезов и чумы на основе структурного объединения антигенов и синтетических полиэлектролитов: автореф. дис. ...докт. вет. наук. 14.00.36. Н.Ю. Алексеева. – М., 1997. – 48 с. 2. Карпунин, Г.И. Химические вакцины для профилактики кишечных инфекций / Г.И. Карпунин, Н.И. Шапиро, Р.А. Андреевская. – Л.: Медицина, 1979. – 192 с. 3. Петросян, Е.А. Комплексные антигены тифо-паратифозной группы бактерий / Е.А. Петросян. – М.: Медгиз, 1961. – 227с. 4. [Korbsrisate, S](#) Characterization of a phase 1-d epitope on *Salmonella typhi* flagellin and its role in the serodiagnosis of typhoid fever / [S. Korbsrisate](#), [A. Thanomsakyuth](#), [N. Banchuin](#) [and all] // [Asian Pac J Allergy Immunol](#). – 1999. – Vol.17(1). – P.31-39. 5. Salazar-Gonzalez, R.M. *Salmonella* flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo / R.M. Salazar-Gonzalez, A. Srinivasan, A. Griffin and all // [J Immunol](#). – 2007. – Vol. 1;179(9). – P. 6169-6175. 6. Ломако, Ю.В. Специфическая профилактика колибактериоза телят на основе адгезивных антигенов возбудителя: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. Ю.В. Ломако: – Минск, 2003. – 142 л. Статья поступила 9.11.2010г.