

РЕЗУЛЬТАТЫ ТИТРАЦИИ ИММУННЫХ СЫВОРОТОК КРОЛИКОВ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНЫМИ O- И VI-АНТИГЕНАМИ, В РЕАКЦИИ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Орлова Е. В.¹, Кутковой В. Б.²

¹ГОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», Пермь, e-mail: e.v.orlova@rambler.ru;

² Филиал ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», e-mail: kutnat1977@mail.ru

Для получения сывороток определенного серотипа проведена цикловая иммунизация кроликов нарастающими дозами сальмонеллезных антигенов. Для опыта использовали сероварианты сальмонелл группы D 1,9,12 (штамм *S. enteritidis*), группы B 1,4,12 (штамм *S. typhimurium*), группы C1 6,7 (штамм *S. choleraesuis* var. *Kunzendorf*), наиболее распространенных в Пермском крае и Российской Федерации. В качестве сравнения использовали для иммунизации Vi-антиген (штамм *S. typhi* O-901) сальмонеллы брюшного тифа, встречающейся чаще среди бактерионосителей. Интерпретацию результатов проводили после иммунизации и тотального кровезабора, полученную иммунную сыворотку крови кроликов оценивали каждый раз в реакции пассивной гемагглютинации с эритроцитарными сальмонеллезными диагностикумами групп B, C, D и Vi производимых филиалом. Сыворотки от каждого кролика в группе титровали методом последовательных двукратных разведений и оценивали диагностический титр по четырехкестной системе. Минимальный установленный диагностический титр в соответствии с нормативными документами составлял (1:160) для Vi сыворотки, для сывороток групп B, C, D – (1:6400). Характерной особенностью сывороток групп B, C, D является нарастание титра после 3 или 4-й иммунизации, превышающий минимальный титр (1:6400) в 2–3 раза и более раза (1:25600; 1:51200), что подтвердило высокую активность антигенного материала, выделенного из штаммов сальмонелл. Сыворотка Vi обладала наименьшей иммунной активностью, суммарный титр составил (1:320), что свидетельствовало об умеренной активности антигенного материала, полученного из штамма сальмонеллы брюшного тифа.

Ключевые слова: сероварианты сальмонеллеза, штаммы, иммунные сыворотки, иммунизация, кролики, титр, реакция пассивной гемагглютинации.

THE RESULTS OF TITRATION IMMUNE SERA RABBITS IMMUNIZED WITH SALMONELLA O- AND VI -ANTIGENS IN THE REACTION OF PASSIVE HEMAGGLUTINATION

Orlova E. V.¹, Kutkovoy V. B.²

¹ Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, e-mail: e.v.orlova@rambler.ru;

² Scientific production Association «Microgen» of the Ministry of health of Russia, branch in Perm, Perm Research and Production Association «Biomed», e-mail: kutnat1977@mail.ru

To obtain serum specific serotype used cyclic immunization of rabbits with increasing doses of Salmonella antigens. For the experiment, serovariant Salmonella group D 1,9,12 (strain *S. enteritidis*), group B 1,4,12 (strain *S. typhimurium*), group C1 6,7 (strain *S. choleraesuis* var. *Kunzendorf*), the most common in the Perm region and the Russian Federation. As a comparison were used for immunization Vi - antigen (strain *S. typhi* O-901) Salmonella typhi, which is found more frequently among the carriers. Interpretation of results was performed after immunization and total blood loss received the immune serum of rabbits was assessed each time in the reaction of passive hemagglutination with erythrocyte diagnostics of Salmonella groups B, C, D and Vi produced by the branch in Perm. Serum from each rabbit in a group were titrated by the method of serial two-fold dilutions and evaluated the diagnostic titer by method four crosses system. The minimum diagnostic titer in accordance with the regulations was (1:160) for Vi serum, sera of groups B, C, D (1:6400). A characteristic feature of the sera of groups B, C, D is the increase in titer after the 3rd or 4th immunization, exceeding the minimum titer (1:6400) in 2-3 times and more times (1:25600; 1:51200), which confirmed the high activity of the antigenic material isolated from strains of Salmonella. Serum Vi had the lowest immune activity, the total titer was (1:320), which indicated moderate activity of antigenic material derived from strains of Salmonella typhi.

Keywords: sera group of Salmonellosis, strains, immune sera, immunization, the rabbits, the titer, reaction of passive hemagglutination.

Сальмонеллезная инфекция до сих пор занимает лидирующие позиции в нозологии кишечных инфекций [1,5,9]. Согласно данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека заболеваемость сальмонеллезом различных групп в 2015 г. по Российской Федерации зарегистрирована в 37026 случаях (25,39 случаев на 100 тыс. населения), заболеваемость брюшным тифом зарегистрирована в 29 случаях (0,02 случая на 100 тыс. населения) [2]. Диагностика заболевания основана, прежде всего, на данных клинической картины, сбора эпидемиологического анализа и результатов бактериологического, биохимического исследования [1,4,5]. Серологические методы являются вспомогательными и направлены для подтверждения клинического диагноза и определения серотипа сальмонеллы [4,6]. Наиболее часто используют метод реакции пассивной гемагглютинации (РПГА), в котором определяют парные сыворотки, которые берут у больного на 4–6 день заболевания (начальный титр) и на 2–3-й неделе, где титр достигает максимума, превышающий исходный в 3–4 и более раз [3,4]. Метод РПГА является традиционным и его применение до сих пор актуально.

Цель

Целью работы явилось изучение динамики титрообразования сыворотки крови кроликов путем исследования парных сывороток после каждого цикла иммунизации в РПГА и подтверждения активности используемых в опыте О-антигенов сальмонелл групп В,С,Д, выделенных из штаммов, наиболее часто циркулирующих в Российской Федерации и Пермском крае [8,9]. Для сравнения изучали в параллельном опыте титрообразование сыворотки кроликов, иммунизированных антигеном Vi из сальмонеллы штамма О-901 (брюшного тифа), которая чаще встречается у бессимптомных бактерионосителей.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», в цехе диагностических препаратов и бактериофагов.

Материал исследования – иммунная сыворотка крови кроликов. В опыт брали половозрелых, физиологически здоровых кроликов, массой 2,5–3,0 кг, без проявления признаков инфекций, кроликов рассаживали в индивидуальные клетки с формированием групп по 5 особей на каждый вид антигена.

Для иммунизации использованы антигены, выделенные из штамма *S. enteritidis* (серогруппа D с антигенной формулой 1,9,12), штамма *S.typhimurium* (серогруппа В, антигенная формула 1,4,12), штамма *S.choleraesuis* var. *Kunzendorf* (серогруппа С₁, антигенная формула 6,7). Из штамма *S. typhi* О-901 выделен Vi-антиген (антигенная формула 9,12,Vi). Штаммовый материал предоставлен институтом им. Г. Н. Габричевского в 2013 г. и отделением бактериофагов филиала в 2015 г.

Метод исследования – реакция пассивной гемагглютинации, выполняемая в 96-луночном планшете для иммунологических реакций с использованием диагностических наборов для конкретной группы сальмонелл (диагностикум эритроцитарный сальмонеллезный О-антигенный серогрупп В, С, D и диагностикум эритроцитарный сальмонеллезный Ви-антигенный).

Результаты исследования

Антигены патогенных штаммов серогрупп В, С₁, D и Vi, представляли собой микробную взвесь, полученную путем технологических превращений из пассажного материала культур сальмонелл. Концентрацию микробных тел оценивали при помощи стандарта ОСО мутности, соответствующей $0,93 \times 10^9$ клеток/мл для микроорганизмов кишечной группы [7]. Антигены вводили по 1,0 мл каждому кролику в краевую вену уха 3–4-хкратно, с интервалом между иммунизацией в 4–5 дней. Первоначальная доза могла составлять 500 млн микробных тел в 1 мл, последняя могла достигать до 4 млрд микробных тел в 1 мл, что определялось уровнем титра. Для его детекции брали пробу крови из краевой вены уха кролика в количестве 3,0 мл после иммунизации и титровали в РПГА. После всего цикла иммунизации осуществляли тотальный кровезабор (50–60 мл с одного кролика), кровь объединяли в пул и определяли конечный титр сыворотки. Для проведения реакции готовили последовательные двукратные разведения полученных сывороток, начиная с 1:100 и титровали до разведения, в котором гарантированно отсутствует специфическая гемагглютинация. Реакцию сопровождали контролем на отсутствие спонтанной агглютинации в сыворотке, для чего добавляли в 2 лунки 1 % взвесь несенсибилизированных эритроцитов (контрольные эритроциты – кэ) по 0,025 мл и 0,05 мл сыворотки, результат обозначали минусом. В каждую лунку предварительно добавили по 0,025 мл диагностикума соответствующей группы. Планшеты осторожно встряхивали и помещали в термостат при температуре 37 °С на 2–2,5 часа. После производили учет реакции методом 4-х крестной системы в каждом разведении, положительный результат учитывался только при 4 и 3 крестах. Результаты титрации сывороток групп В и С₁ в РПГА представлены в таблицах №№ 1,2, начальная иммунизация в 0,5 млн микробных тел/мл не представлена из-за неинформативности материала.

Как видно из таблицы № 1, суммарный титр пула сывороток серогруппы В составил 1:25600. Иммунизация данной группы прошла успешно, цикл состоял из трех иммунизаций, у всех кроликов регистрировался высокий титр, превышающий допустимый начальный титр 1:6400 в 2–3 раза.

Таблица 1

Результаты титрации иммунной сыворотки серогруппы В

Доза антигена, микробных тел/мл	Кролики	Антиген серогруппы В											
		титр; учет в крестах реакции											
		100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	КЭ
1,0 млрд.	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-
	2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-
	3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-
	4	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-
	5	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-
2,0 млрд.	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-
	2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-
	3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-
	4	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-
	5	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-
тотальный забор	пул сы-вороток	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-

Таблица 2

Результаты титрации иммунной сыворотки серогруппы С₁

Доза антигена, микробных тел/мл	Кролики	Антиген серогруппы С ₁											
		титр; учет в крестах реакции											
		100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	КЭ
1,0 млрд.	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	-	-	-	-	-
	2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-	-	-	-
	3	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-	-	-	-
	4	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-	-	-
	5	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	-	-	-	-	-
2,0 млрд.	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-	-	-
	2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-	-
	3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-	-	-
	4	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-
	5	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-
4,0 млрд.	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	-	-	-
	2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-	-
	3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-	-
	4	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	-	-	-
	5	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-	-
тотальный забор	пул сы-вороток	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-	-

Согласно данным таблицы № 2, понадобился больший цикл иммунизации для кроликов серогруппы С₁, при второй иммунизации (1,0 млрд микробных тел/мл.) титр был ниже

допустимого (1:6400) в 2 раза. Существенное нарастание титра в серогруппе С₁ произошло только после введения 4,0 млрд микробных тел/мл, групповой титр из пула составил 1:12800. Для получения иммунной сыворотки кроликов серогруппы D понадобилась 3-х кратная иммунизация, последняя в дозе 2,0 млрд микробных тел/мл. Суммарный титр в пуле достаточно высокий – 1:25600, результаты получились одинаковые с группой В (данные таблицы № 1), поэтому детализированная информация по титрации D сыворотки не представлена. Общая динамика иммунного цикла по данным таблиц положительная, кролики хорошо перенесли 3-х и 4-х кратную иммунизацию возрастающими дозами антигенов, нарастание уровня титров четкое, превышающее минимальный титр (1:6400) в 2 раза для серогруппы С₁, в 3 раза для серогрупп В и D.

Иммунизация кроликов антигеном Vi происходила по аналогичной схеме. Допустимый минимальный диагностический титр для сыворотки сальмонеллезной Vi составляет 1:160. Готовили последовательные двукратные разведения полученных сывороток, начиная с 1:10, и титровали до разведения, в котором гарантированно отсутствует специфическая гемагглютинация. При учете также проводился контроль сыворотки на отсутствие спонтанной агглютинации. Результаты титрации Vi сыворотки представлены в таблице № 3.

Как видно из данных таблицы № 3, результаты иммунизации Vi антигеном кроликов получились неоднозначные, динамика титрообразования у каждого кролика протекала различно. При дозе в 0,5 млрд микробных тел практически все кролики не дали иммунного ответа. Рост титра наблюдался только после 3 и 4-й иммунизации, наибольший иммунный ответ был достигнут у кролика 1 (титр 1:1280) и 5 (титр 1:640), кролик 3 пал в процессе опыта, не достигнув даже минимального титра. Кролики 2 и 4 дали титр на уровне минимально допустимого титра 1:160. Суммарный титр пула сывороток составил 1:320.

Заключение

Согласно полученным данным по результатам исследования иммунных сывороток серогрупп В, С, D в РПГА прослеживается четкое нарастание титра, что свидетельствует о высокой антигенной активности штаммового материала используемого в иммунизации. Наибольшей активностью обладали антигены, выделенные из штаммов В и D (*S.typhimurium* и *S.enteritidis*), на одно разведение в титре был ниже уровень у С (*S.choleraesuis* var. *Kunzendorf*). Цикл иммунизации хорошо перенесен кроликами, ни одно животное не пало в процессе опыта до его завершения, титр нарастал уже после 3-й иммунизации (2,0 млрд микробных тел/мл), суммарный титр пула каждой сыворотки в 2–3 раза превышал минимально допустимый, согласно классической схеме парных сывороток. Далее пул сыворотки подвергался технологическим превращениям и использовался в качестве сухих контрольных сывороток при комплектации О-сальмонеллезных диагностических наборов.

Результаты титрации иммунной сыворотки Vi

Доза антигена, микробных тел/мл	Кролики	Антиген Vi									
		титр; учет в крестах реакции									
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	кЭ
0,5 млрд.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	3+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0 млрд.	1	3+	3+	3+	2+	-	-	-	-	-	-
	2	3+	3+	2+	-	-	-	-	-	-	-
	3	3+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	3+	3+	3+	3+	2+	-	-	-	-	-
	5	2+	2+	2+	2+	2+	2+	-	-	-	-
2,0 млрд.	1	3+	3+	4+	4+	4+	4+	-	-	-	-
	2	3+	3+	3+	2+	2+	-	-	-	-	-
	3	3+	2+	2+	2+	-	-	-	-	-	-
	4	4+	4+	3+	3+	3+	2+	-	-	-	-
	5	3+	3+	3+	3+	3+	4+	4+	-	-	-
4,0 млрд.	1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	-
	2	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-	-	-
	3	пал во время 4-й иммунизации									
	4	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-	-	-	-
	5	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	-	-
тотальный забор	пул из сывороток	4+	4+	4+	4+	4+	4+	-	-	-	-

Анализ результатов титрации Vi сыворотки показал, что кролики плохо переносят иммунизацию, иммунный ответ слабый, титров после первой иммунизации (500 млн микробных тел/мл) практически нет, после второй иммунизации нет достижения даже минимального титра. В процессе опыта одно животное погибло (кролик 3), при его вскрытии отмечены явления воспаления тонкого кишечника, возможно, возник напряженный иммунитет, адекватного титрообразования не наступило даже после третьей иммунизации, после введения 4,0 млрд микробных тел/мл произошла гибель. Максимально достигнутый титр составил 1:1280 только у кролика 1, у двух животных отмечен титр в минимальном значении. За счет сведения пула сывороток удалось получить средний титр 1:320. Возможно, медленное нарастание титров связано со структурой самого поверхностного Vi антигена, выделенного из штаммового материала *S. typhi* O-901, антигенная активность штамма

умеренная, о чем свидетельствует динамика образования титров. Далее сыворотка подвергалась технологическим превращениям и также использовалась в качестве контрольной при комплектации сальмонеллезного Vi – диагностикума.

Таким образом, антигены, выделенные из штаммов патогенных сальмонелл серогрупп В,С,D, чаще других встречающихся на территории Российской Федерации (25,39 случаев на 100 тыс. населения), в том числе и Пермского края, обладали наиболее высокой активностью при изучении динамики образования титров в РПГА. Антигенный материал, выделенный из штамма сальмонеллы брюшного тифа, значительно реже регистрирующегося на территории Российской Федерации (0,02 случая на 100 тыс. населения), обладал наименьшей активностью при определении титра в РПГА.

Список литературы

1. Богуцкий М. И. Сальмонеллезная инфекция // Журн. ГрГМУ. – 2011. – № 1. – С.7-11.
2. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях. Данные федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://rosпотребнадзор.ru/activities/statistical-materials/statistic-details.html> (дата обращения 19.01.2016).
3. Казанцев А. П. Справочник по инфекционным болезням / А. П. Казанцев, В. С. Матковский. – М.: Медицина, 1985. – С.212-219.
4. Лобзин Ю. В. Руководство по инфекционным болезням: ч. I. – СПб., 2000. – С. 7-27.
5. Мавзютов А. Р., Мурзабаева Р. Т., Назмутдинова Р. Г., Мирсаяпова И. А. // Журн. Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 3. – С. 40-42.
6. МУ 4.2.2723-10 Методические указания по лабораторной диагностике сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды. – М.: ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора Минздрава России, 2010. – 50 с.
7. ОСО 42-28-84-2013 ОСО Мутности. – М.: Стандарт ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, инструкции по применению, 2014. – 2с.
8. Рожнова С. Ш. Перспективы организации расширенной системы надзора за сальмонеллезом в России / С. Ш. Рожнова, Н. К. Акулова, О. А. Христюхина // Журн. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – № 6. – С. 28-34.
9. Шитова О. И. Эпидемиологические особенности, биологическая характеристика и чувствительность к антимикробным препаратам сальмонелл, циркулирующих в Пермском