

УДК 579.841.112 : 547.743.1

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО
БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

М.А. Кузнецов, А.А. Щербаков, С.В. Савина, В.М. Скорляков, С.В. Иващенко, В.С. Муртаева

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Сосудистый бактериоз крестоцветных является одним из наиболее опасных заболеваний сельскохозяйственных культур. Он поражает практически все известные растения, относящиеся к семейству крестоцветных. Его возбудитель широко распространён в природе и обладает высокой патогенной активностью [1]. В связи с этим, его диагностика, а также профилактика вызываемых им бактериозов, является актуальной задачей.

На сегодняшний день показано, что наиболее эффективным методом диагностики сосудистого бактериоза капусты является иммуноферментный анализ (ИФА). Он обладает достаточно высокой чувствительностью, позволяет выявлять наличие возбудителя при минимальной степени обсеменения и, по сравнению с другими методами, отличается простотой, что делает его удобным для массового применения.

При создании иммуноферментных диагностических систем важное значение имеет правильный выбор гипериммунной сыворотки, содержащей антитела к выявляемому возбудителю. При этом, значение имеют не только характеристики возбудителя, антигены которого используются для получения сыворотки, но и характеристики применяемого для этого адьюванта. Современные разработки в этой области позволяют получать диагностические препараты с большей эффективностью, уменьшая необходимые для этого материальные и временные затраты.

Целью работы являлось создание диагностического препарата на основе иммуноглобулинов к клеточной стенке возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных. В ходе исследования решались задачи по получению препарата клеточной стенки *X. campestris*, получению гипериммунных кроличьих сывороток с применением различных адьювантов и оценке специфичности этих сывороток и применявшихся для их получения адьювантов.

Необходимое для работы количество биомассы микроорганизмов *X. campestris* B-611 и препарата дезинтегрированных клеточных мембран получали по общепринятым методикам [2, 3]. Концентрацию белков в препарате определяли спектрофотометрически по методу Лоури [4].

Гипериммунную сыворотку получали подкожной иммунизацией кроликов вдоль спины в 3–4 точки в объёме 1 мл смеси антигена и адьюванта в соотношении 1:1 с интервалом между последующими иммунизациями в 2 недели. Всего было проведено 7 иммунизаций. В контрольных группах антиген заменяли физиологическим раствором. В качестве адьювантов использовались полный адьювант Фрейнда (ПАФ) и химическая полиэлектролитная субстанция, состоящая из 0,05 %-й раствор полиазолидинамммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, в физиологическом растворе (ПААГ). Всего было иммунизировано 4 группы кроликов.

Чувствительность и специфичность гипериммунных сывороток изучали в непрямом твёрдофазном иммуноферментном анализе на планшетах (Linbro, США). [5]

В ИФА использовали дезинтегрированные мембраны *X. campestris*, формализированные клетки *Xanthomonas campestris* B-611 (получен из коллекции ризосферных бакбактерий ИБФРМ РАН), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027 (*P. aeruginosa*) (получен из ВКПМ ФГУП ГосНИИГенетика), *Yersinia pseudotuberculosis* III (*Y. pseudotuberculosis*), *Yersinia enterocolitica* 66–82 (O:3) (*Y. enterocolitica*), *Escherichia coli* 1027 (*E. coli*) (получены из ГКПМ ФГУЗ РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора).

Иммунизация кроликов дезинтегрированными мембранами *X. campestris* позволила получить сыворотки крови с высоким титром специфических антител. Максимальный титр специфических антител в крови обеих опытных групп иммунизированных животных составил 1:409600, однако следует отметить, что количество антител достигало максимального уровня при использовании в качестве адьюванта ПААГ на месяц раньше, чем полного адьюванта Фрейнда. В контрольных группах высоких титров специфических антител не отмечено, что свидетельствует о стимулирующем влиянии адьювантов на антителообразование только в сочетании с антигеном.

В процессе иммунизации также наблюдалось отсутствие абсцессов в местах введения комплекса антиген + ПААГ и наличие данных образований при использовании ПАФ.

При оценке специфичности полученных гипериммунных сывороток крови отмечены их неспецифичные реакции с *P. aeruginosa* и представителями семейства *Enterobacteriaceae* в титрах 1:800–1:1600. Однако положительные титры специфических антител *X. campestris* на порядок выше положительных титров антител к другим видам бактерий.

Таким образом, можно сделать выводы о том, что:

- Препарат дезинтегрированных мембран *X. campestris* может быть использован для получения гипериммунных сывороток с высоким содержанием специфических антител и конструирования на его основе иммуноферментных тест-систем для диагностики сосудистого бактериоза крестоцветных;

- При иммунизации кроликов дезинтегрированными мембранами *X. campestris* в качестве адьюванта эффективно использовать 0,05 %-й раствор полиазолидинамммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов.

- Использование в качестве адьюванта 0,05 %-го раствора полиазолидинамммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, позволяет уменьшить сроки проведения иммунизации и уменьшить затраты на получение диагностической гипериммунной сыворотки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.С. Мазурин, Ф.С. Джалилов, А.Н. Игнатов, Ю.А. Варицев – Усовершенствование диагностики заражённости семян капусты возбудителем сосудистого бактериоза методом иммуноферментного анализа. // Известия ТСХА, выпуск 1, 2009 год
2. Рысмухамбетова, Г.Е. Экзополисахариды ксантомонад и клебсиелл: физико-химические, биологические свойства и перспективы применения [Текст]: автореф. дис. на соиск. учён. степ. канд. биол. наук / Рысмухамбетова Гульсара Есенгильдиевна; Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова. – Саратов, 2007. – 151 с.
3. Иващенко, С.В. Применение мембранных белков в диагностике иерсиниозов [Текст] / С.В. Иващенко // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2013. – № 2. – С. 17–18.
4. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, № 1. – P. 265–275.
5. Hornbeck, P. Enzyme-linked immunosorbent assays / P. Hornbeck // Current Protocols in Immunology. – 1991. – P. 2.1.2–2.1.22.