

УДК 632.4.07

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДВУХ СПОСОБОВ ИММУНИЗАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИСЫВОРОТОК К САПРОФИТНОЙ МИКОПЛАЗМЕ

М. С. ДУНИН, Я. М. ЭЛЬ-ФАХААМ, О. П. ВИНИЦКАЯ  
(Кафедра фитопатологии)

В последние годы установлено, что ряд инфекционных болезней растений (группа желтух), возбудителями которых считались вирусы, имеют принципиально иную этиологию и представляют собой особую группу заболеваний.

В августе 1967 г. Дой и его коллеги предположили, что возбудителями желтушных заболеваний являются не вирусы, а микроорганизмы, напоминающие микоплазмы [4], плевропневмоподобные организмы PPLO или пситтакозлимфогранулома-трахома (*Clamidia-Bedsonia*) [2]. Гипотеза была основана на электронно-микроскопическом наблюдении плеоморфных телец во флоэме больных растений. В настоящее время известно, что подобные плеоморфные микоплазмозооидные тельца были обнаружены еще раньше во флоэме желтушных растений Мараморшем и другими исследователями [6]. Однако их значение в этиологии заболеваний не было доказано до опубликования работ Дой и др. в 1967 г. [2, 5].

Согласно современным представлениям микоплазмозооидные организмы являются возбудителями большинства, если не всех, желтушных болезней растений.

Микоплазменные тельца, обнаруженные в растениях, пораженных различными желтушными заболеваниями, морфологически весьма сходны с известными сапрофитными микоплазмами и с микоплазмами, паразитирующими в организме человека и животных, но прямым доказательством принадлежности наблюдаемых у желтушных растений микоплазмозооидных телец к микоплазме являлось бы обнаружение между ними антигенного родства.

С этой целью нами и были получены кроличьи сыворотки к сапрофитной микоплазме *Mycoplasma laidlawii*.

Микоплазмы отличаются слабой антигенностью, в связи с этим применение общепринятых методов иммуностимуляции не всегда приводит к получению специфических антисывороток с высокими титрами антител. Анализ данных литературы свидетельствует об относительно высокой эффективности методов Стейнбриджа и Хайфлика в модификации Чумаченко и Смирновой [1]. Взяв за основу обе схемы иммунизации, мы испытали следующие их варианты: 1 — схема Стейнбриджа и Хайфлика [7] в модификации Чумаченко и Смирновой [1]; 2 — схема, предложенная нами.

Для стимуляции образования антител применяли неполный адъювант Фрейнда, в состав которого входило 5 мл обезвоженного ланолина и 15 мл вазелинового масла.

В варианте 1 при первой инъекции вводили 0,5 мл суспензии микоплазмы в смеси с 0,5 мл неполного адъюванта Фрейнда (НАФ) в пять точек по 0,2 мл под коготки в подушечки лап и еще 1 мл суспензии антигена внутривенно. Вторая инъекция проводилась через месяц: 1 мл антигена вводили внутривенно и 1 мл смеси антигена и НАФ — в пять точек по 0,2 мл подкожно в бок. Через 2 недели 1 мл антигена вводили внутривенно и 1 мл смеси антигена с адъювантом в отношении 1:1 — внутримышечно в заднюю лапку. Четвертая инъекция проводилась через 1 месяц: 1 мл антигена вводили внутривенно, 1 мл смеси антигена и НАФ — внутримышечно и 1 мл такой же смеси — подкожно по 0,1 мл в 10 точек в бок. Весь цикл иммунизации длился более 3 мес (100 дней без ревакцинации) и 120 дней при реиммунизации и включал 26 инъекций в различные точки тела кролика.

Через 9—10 дней после четвертой вакцинации у кроликов из краевой вены уха брали кровь, получали антисыворотки в стерильных условиях и в пробной порции сыворотки определяли титры антител.

В варианте 2 1 мл антигена в концентрации 1/200 вводили внутривенно и 1 мл смеси антигена и НАФ в отношении 3:1 по 0,2 мл в 5 точек под коготки в подушечки лапок. Вторую инъекцию проводили через 5 дней: 1,5 мл 1/200 антигена внутривенно. Последующие инъекции делали каждый 3-й день. При третьей инъекции вводили 1 мл антигена в концентрации 1/200 внутривенно и 1 мл смеси 1:1 антигена и НАФ подкожно по 0,2 мл в 5 точек в бок, при четвертой — 1 мл антигена в концентрации 1/100 внутривенно, при пятой — 1 мл антигена и НАФ в смеси 1:1 внутримышечно и 1 мл антигена в концентрации 1/200 внутривенно; шестой — 1 мл антигена концентрации 1/100 внутривенно; седьмой — 1 мл антигена 1/200 внутривенно и 1 мл НАФ подкожно; восьмой — 1 мл антигена в концентрации 1/200 внутривенно и 1 мл смеси 1:1 антигена на НАФ внутримышечно. Спустя 9—10 дней после восьмой инъекции у кроликов брали кровь. Весь цикл иммунизации по второй схеме длился 28—30 дней без реиммунизации, 45 дней при реиммунизации и включал 21 инъекцию.

По каждой схеме иммунизации вводилось одинаковое суммарное количество антигена и адъюванта. Для повышения титра антисывороток кролики повторно иммунизировались через месяц после последней инъекции

по первой схеме и через две недели после последней инъекции по второй.

Кролики в обоих вариантах опыта относились к породе шиншила, имели массу 3—3,5 кг, были одинакового пола и возраста, содержались при аналогичных режимах питания.

Сравнительное изучение антисывороток, полученных при использовании двух схем иммунизации, проводилось с помощью реакции нейтрализации (или ингибиции роста) и реакции агглютинации.

Для приготовления антигена сапрофитной микоплазмы в качестве исходного материала мы использовали штамм *Mycoplasma laidlawii* который был нам любезно предоставлен проф. Г. Я. Каган (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи АМН СССР). Полученный штамм культивировался при температуре 35° на специальной питательной среде, состоящей из трипсинизированного бульона мышцы бычьего сердца, к которому добавляли 10% дрожжевого гидролизата и 10% нормальной лошадиной сыворотки. Поддерживался и сохранялся штамм в чистой культуре согласно методике лаборатории по изучению микоплазм и L-форм бактерий названного выше института. Свойства выращенной нами микоплазмы были подтверждены специалистами этой лаборатории. Культура штамма в возрасте 5—6 дней осаждалась при 10000 об/мин в течение 45 мин, трехкратно отмывалась физиологическим раствором, осадок ресуспендировался в физиологическом растворе в соотношении 1/100 объема от исходной среды. Полученную суспензию использовали для инъекций кроликов и постановки серологических реакций.

Для проверки эффективности обеих схем в получении специфической сыворотки с высоким титром антител и выяснения роли ревакцинации в повышении титра мы применяли реакцию нейтрализации, предложенную Эдвардом и Фитцджеральдом в 1954 г. [3]. В пробирки диаметром 5—8 мм вносили по 0,2 мл соответствующего 2-кратного разведения сыворотки в физиологическом растворе и 0,2 мл 72-часовой культуры микоплазмы в разведении  $10^{-3}$ , что соответствовало  $10-10^5$  колониеобразующих единиц в 1 мл среды. Эту смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем к ней добавляли 1,6 мл 0,3% раствора агара, приготовленного на трипсинизированном переваре мышцы сердца крупного рогатого скота с добавкой 10% лошадиной сыворотки (рН 7,6—7,8).

Результаты реакции учитывали на 5—7-й день инкубации при 37°. За титр реакции нейтрализации (ингибиции) принимали выраженное подавление роста микоплазм, соответствующее уменьшению числа колоний на 75% (таблица).

Как показано в таблице, титр антисывороток в реакциях ингибиции колебался от 1:8 до 1:32 (без ревакцинации) и от 1:32 до 1:256 (после ревакцинации), что свидетельствует о резком стимулирующем эффекте реиммунизации. При использовании первой схемы были получены сыворотки с несколь-

ко более высокими титрами (на одно разведение), чем при использовании второй схемы.

Дополнительную проверку качества антисывороток проводили с помощью реакции агглютинации.

Для получения антигена сапрофитной микоплазмы взвесь микроорганизмов подвергали дезинтеграции с помощью ультразвука и по оптическому стандарту мушности Государственного контрольного института вакцин и сывороток им. Л. А. Тарасевича (Москва) готовили взвесь в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл физиологического раствора, которую добавляли по 0,2 мл к такому же объему каждого разведения сыворотки. Пробирки держали 2 ч при 37°, затем штатив с пробирками вынимали из термостата, отмечали предварительные результаты и оставляли на сутки при комнатной температуре. На следующий день отмечали окончательные результаты, которые, как свидетельствуют данные таблицы, подтверждают результаты, полученные с помощью реакции ингибиции.

Данные таблицы показывают, что при использовании первой схемы иммунизации антисыворотки имеют более высокий титр (в среднем на одно разведение), чем при второй схеме, но для их получения необходим срок около 100 дней. В то же время использование второй схемы дает возможность получить активные антисыворотки через 28—30 дней, т. е. продолжительность иммунизации в 3 раза меньше.

Реиммунизация через месяц после последней инъекции по первой схеме, как и через две недели после последней инъекции по второй схеме, вызвала повышение титров к *M. laidlawii*. Наши данные подтверждают и результаты, полученные Чумаченко и Смир-

Титр антител против *Mycoplasma laidlawii* в сыворотках в зависимости от схемы иммунизации

Схема иммунизации	№ кролика	Без ревакцинации	После ревакцинации	Длительность цикла иммунизации (без реиммунизации), дни
Реакция нейтрализации				
I	108	1:32	1:256	100
	110	1:8	1:64	
	111	1:32	1:256	
II	105	1:8	1:32	28—30
	106	1:16	1:128	
	109	1:16	1:128	
Реакция агглютинации				
I	108	1:800	1:1600	100
	110	1:400	1:800	
	111	1:800	1:1600	
II	105	1:320	1:400	28—30
	106	1:320	1:1600	
	109	1:640	1:800	

новой [1] при изучении ими антисывороток к *M. laidlawii* и L-формам бактерий.

Полученные нами антисыворотки были использованы для выяснения серологического родства сапрофитной микоплазмы и возбудителей следующих микоплазмозов растений: столбура томатов, табака, дурмана, израстания цветов клевера, махровости черной смородины. Результаты этих исследований составляют предмет отдельного сообщения, но коротко обобщая их, можно утверждать, что при использовании антисывороток к сапрофитной микоплазме в реакциях с антигенами растений, пораженных желтушными заболеваниями, нет существенной разницы между антисыворотками, полученными по первой и второй схемам. В связи с этим

вторую схему иммунизации можно рекомендовать для использования как имеющую более короткий срок исполнения (28—30 дней).

### Выводы

1. Для получения антисывороток к сапрофитной микоплазме возможно наряду со схемой Стейнбриджа и Хайфлика в модификации Чумаченко и Смирновой использовать предложенную нами схему, которая позволяет сократить в 3 раза продолжительность цикла иммунизации.

2. Реннммунизация при использовании как первой, так второй схем, резко повышает титр антител к сапрофитной микоплазме.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Чумаченко Н. В., Смирнова Т. Д. Лабораторное дело, 1974, № 1, с. 39—41. — 2. Doi Y. M., Teranaka M., Yoda T. K., Asuyama H. Ann. Phytopath. Soc. Japan., 1967, vol. 33, N 4, p. 259—266. — 3. Edward A., Fitzgerald W. — J. of General Microbiology, 1954, N 5, p. 566—568. — 4. Hayflick L. — Ann. N. Y. Acad. Sci. 1967, N 143, p. 1—824. — 5. Ishiie T.,

Doi Y. K., Yoda K., Asuyama H. — Ann. Phytopat. Soc. Japan., 1967, vol. 33, N 4, p. 267—275. — 6. Maramorosch K., Shikata E., Grapados R. R., Frans. N. Y., Acad. Sci., Ser. II, 1968, vol. 30, N 6, p. 841—855. — 7. Steinbridge W., Hayflick E. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, vol. 79, p. 433—437.

*Статья поступила 13 марта 1979 г.*

### SUMMARY

Comparative study of the two ways of immunization to obtain antisera to saprophytic mycoplasma was conducted at the Timiryazev Academy at the immunologic laboratory of the Experimental Station for plant protection. The cycle of immunization by the standard scheme of Steinbridge and Hayflick modified by Chumachenko and Smirnova lasts not less than 100 days, while the scheme suggested by the authors allows to obtain active antisera in 28—30 days, that is it makes the process of immunization 3 times shorter. The antisera obtained according with the two schemes compared did not differ essentially in their quality.