

Р.В. Грицай, О.С. Броварська, Н.В. Житкевич, Л.Д. Варбанець

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна*

СЕРОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Імунохімічними дослідженнями восьми штамів *Ralstonia solanacearum* шість штамів було віднесено до чотирьох серогруп, дві з яких утворені парами штамів *R. solanacearum* 4 і 526 та 758 і 7954; дві інші представлені по одному штаму – TX_1 та TS_3 відповідно. Антигенна структура О-полісахариду штаму 7954 поєднує в собі антигенні епітопи штамів *R. solanacearum* 4, 35, 526, 749, однак відсутність кросреактивності не дозволяє об'єднати їх в одну серогрупу. Ця обставина, а також те, що антисироватка до *R. solanacearum* шт. 749 в реакції з ЛПС шт. 526 утворює дві смуги преципітації (тоді як в гомологічній лише одну) може бути пояснено відмінностями компонентного складу термостабільних імуногенів (що слугували для отримання антисироваток) та очищених ЛПС, які використовувалися в імунохімічних реакціях як антигени.

Ключові слова: Ralstonia solanacearum, ліпополісахариди, серологічна активність.

Ralstonia solanacearum – небезпечний фітопатоген, що є карантинним об'єктом із високим ризиком поширення та занесення на нові території [12]. Серологічні методи діагностики збудника з використанням поліклональних антисироваток до фіксованих глютаральдегідом бактеріальних клітин, що входять до складу комерційних діагностикумів, характеризуються відносно високим відсотком хибних результатів [9]. Це обумовлено гетерогенною природою самого виду, яка визначає антигенну неоднорідність імуногенних препаратів. Спроби створення імунологічних тест-систем для *R. solanacearum*, основаних на використанні моноклональних антитіл до визначених епітопів поверхні бактеріальної клітини, хоч і є обнадійливими, поки не знайшли свого завершення в практичному застосуванні. Перспективним в цьому напрямі є використання ліпополісахаридів (ЛПС) клітинної оболонки, які є імунологічно активними, просторово доступними для взаємодії з антитілами та стабільними до впливу денатуруючої дії зовнішніх умов [10]. Розкриття імунохімічних особливостей ліпополісахаридів *R. solanacearum* є важливою передумовою в реалізації даного завдання.

Штами *R. solanacearum* виявляють високий рівень гетерогенності, що було продемонстровано як на основі досліджень культуральних властивостей, так і на молекулярному рівні [14]. Серотипізація є простим методом для встановлення внутрішньовидової структури мікроорганізмів, що базується на співставленні антигенних особливостей їх макромолекул. На відміну від бактерій, патогенних для теплокровних, де встановлення сероспецифічності штаму є рутинною процедурою, для більшості фітопатогенних мікроорганізмів, включаючи *R. solanacearum*, досі не створено внутрішньовидової класифікаційної схеми, заснованої на О-антигенній специфічності їх ЛПС. Раніше на основі результатів перехресних імунологічних реакцій штамів *R. solanacearum* з колекції ICMR, що представляють кожен із 8 типів структури О-полісахаридів (О-ПС), було виділено 5 серогруп [4].

Метою даної роботи було вивчення антигенної активності ЛПС *R. solanacearum* різного географічного походження.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на восьми штаммах *R. solanacearum*: 749, 758, 7954, 8202, отриманих із Новозеландської колекції (ICPM); TX_1 та TS_3 – В'єтнамської колекції; 4, 35, 526 – колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України.

Культури бактерій вирощували глибинним способом на качалках на синтетичному середовищі N [16] при 28 °С, протягом 31-70 год, при 240 об/хв.

Антисироватки до прогрітої суспензії бактерій (2,5 год при 100 °С) отримували шляхом чотирьох підшкірних ін'єкцій кролів зростаючими дозами антигену (0,5 – 2 × 10⁹ мікробних клітин в мл) з повним ад'ювантом Фрейнда та однієї внутрішньовенної імунізації (10⁹ кл/мл)

з інтервалами між ін'єкціями 4–8 діб. Забір крові здійснювали на 7-й день після останньої імунізації.

Виділення ліпополісахаридів проводили водно-фенольним методом [3] із висушених ацетоном і ефіром клітин. Отримані препарати очищали від низькомолекулярних домішок діалізом проти водопровідної, а потім дистильованої води. Очистку від нуклеїнових кислот здійснювали шляхом осадження ТХУ і ультрацентрифугування (104000 g, 4 год), після чого ліофілізували.

Антигенну активність досліджуваних ЛПС визначали методами кільцепреципітації та подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні [1].

Результати та обговорення. За результатами кільцепреципітації в гомологічних системах було показано, що ЛПС всіх досліджуваних штамів *R. solanacearum* виявили досить високий титр антисироваток (мінімальна концентрація антигену, при яких спостерігалась чітко позитивна реакція, становила 0,625–1,125 мкг/мл) (табл. 1).

Таблиця 1

Титр антисироваток в реакції кільцепреципітації з ЛПС дослідних штамів *R. solanacearum*

Антисироватка	Концентрація ЛПС, мкг/мл							
	2000	40	20	10	5	2,5	1,125	0,625
749	+	+	+	+	+	+	+	
758	+	+	+	+	+	+	+	+
7954	+	+	+	+	+	+	–	–
4	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	–	–	–	–	–	–
526	+	+	+	+	–	–	–	–
8202	+	+	+	+	+	+	–	–
ТХ ₁	+	+	+	+	+	+	+	–
ТS ₃	+	+	+	+	–	–	–	–

В реакції подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні отримані антисироватки взаємодіють як в гомологічних, так і гетерологічних системах (рис. 1, табл. 2). В гомологічних реакціях спостерігалось утворення подвійних (шт. 758, 4, 526) та одинарних (шт. 749, 35, 7954, ТХ₁ та ТS₃) преципітаційних смуг. Базуючись на різниці в швидкості дифузії S- та R-форм ЛПС, утворення декількох смуг преципітації в даному випадку може свідчити про просторову доступність епітопів кору для взаємодії з антитілами. Про це свідчить і різний вміст 2-кето-3-дезоксиктонової кислоти (КДО) в досліджуваних ЛПС: від слідових кількостей до 0,22 % до сухої маси ЛПС. Відомо, що відносна молярна доля КДО в молекулі ЛПС зменшується при збільшенні зовнішнього кору і полісахаридного фрагмента. Результати визначення молярної долі КДО у досліджуваних штамів (рис. 2) свідчать, що її доля в препаратах ЛПС штамів 758 і 7954 в декілька разів більша, ніж в ЛПС інших штамів. Це дає можливість припустити домінування в структурі ЛПС *R. solanacearum* 758 і 7954 олігосахариду кору, в той час як частка O-специфічного полісахариду є незначною.

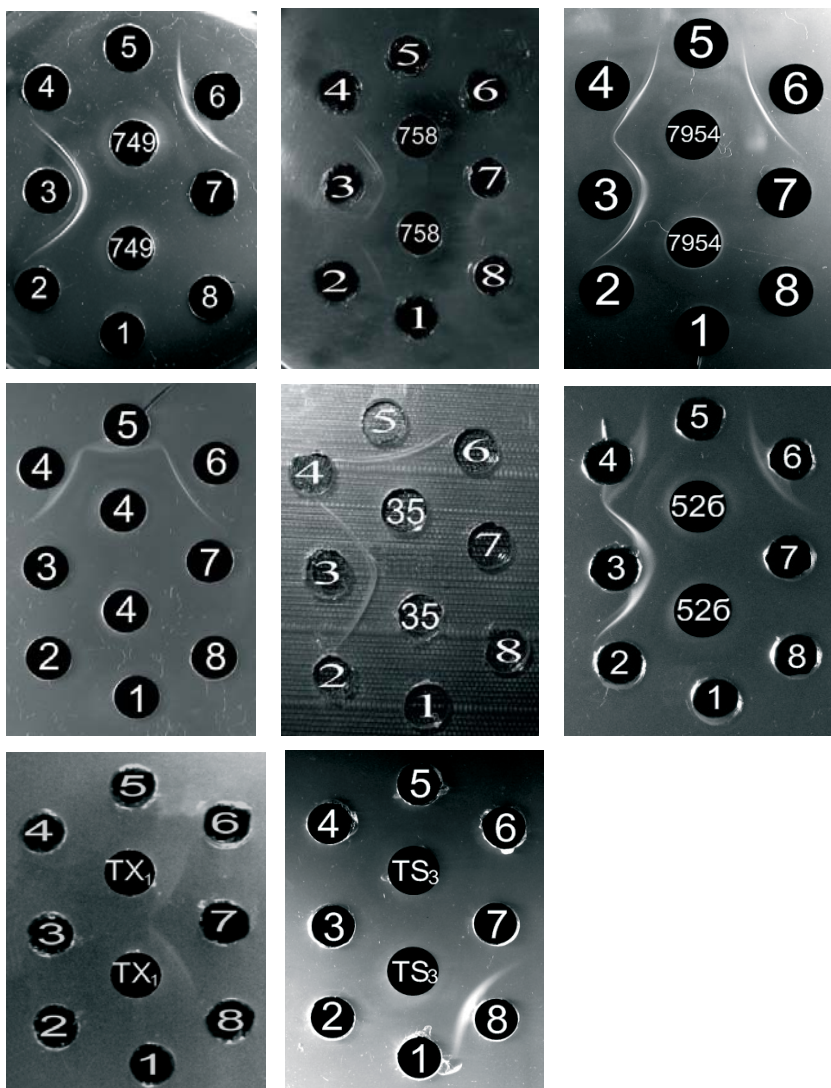


Рис. 1. Реакція подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні ЛПС *R. solanacearum* штамів 749 (1); 758 (2); 7954 (3); 4 (4); 35 (5); 526 (6); TX₁ (7); TS₃ (8) з О-антисироваткою до штамів *R. solanacearum*: 749, 758, 7954, 4, 35, 526, TX₁, TS₃

Таблиця 2

Результати реакції подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні ЛПС *R. solanacearum* з антисироватками

ЛПС штамів	Антисироватка до штамів:							
	749	758	7954	4	35	52 б	TX ₁	TS ₃
749	+-	-	-	-	-	-	-	-
758	-	+	-	-	-	-	-	-
7954	+++	++	+	-	+	+	-	-
4	-	-	+	++	-	++	-	-
35	-	-	-	++	++	-	-	-
52 б	++	-	+	+	-	++	-	-
TX ₁	-	-	-	-	-	-	+	-
TS ₃	-	-	-	-	-	-	-	+

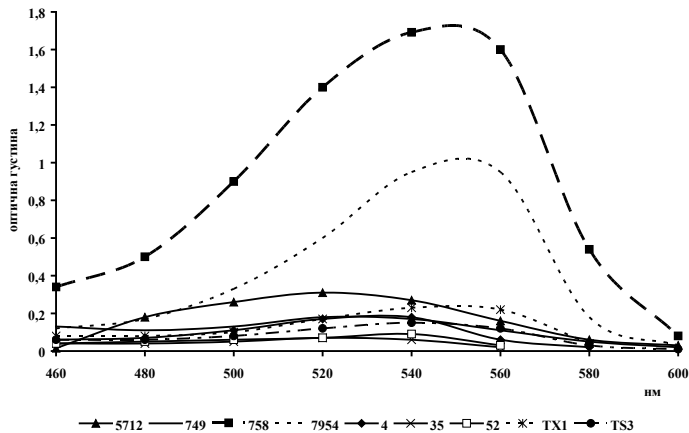


Рис. 2. Спектри поглинання продуктів реакції гіббарбітурової кислоти з ЛПС *R. solanacearum*

При проведенні перехресних імунологічних реакцій встановлено наступні закономірності:

- взаємну кросреактивність виявили лише дві пари штамів – 4 і 526 та 758 і 7954;
- антисироватки до штамів 35 та 749 взаємодіяли як з гомологічними ЛПС, так і проявляли здатність до преципітації ЛПС шт. 7954. В той же час антисироватка до шт. 7954 не реагувала з ЛПС шт. 35 та 749, але була активна щодо ЛПС шт. 526 та 4. Це може свідчити про складність антигенної структури ЛПС шт. 7954 і її неповну відповідність ЛПС штамів 4, 35, 526, 749;
- антисироватки до шт. TX₁ та TS₃ взаємодіяли лише з гомологічними антигенами. Отже їхня антигенна структура максимально відрізняється від О-полісахаридів інших досліджуваних ЛПС;
- по дві преципітаційні смуги утворює антисироватка до шт. 4 із ЛПС шт. 35 та антисироватка до шт. 749 із ЛПС шт. 526.

Враховуючи згадане, можна виділити чотири серогрупи, дві з яких утворені парами штамів 4 і 526 та 758 і 7954; дві інші представлені по одному штаму – TX₁ та TS₃ відповідно. Антигенна структура О-полісахариду штаму 7954 поєднує в собі антигенні епітопи штамів 4, 35, 526, 749, однак відсутність кросреактивності не дозволяє об'єднати їх в одну серогрупу. Ця обставина, а також те, що *R. solanacearum* шт. 749 в реакції з ЛПС шт. 526 утворює дві смуги преципітації (тоді як в гомологічній лише одну) може бути пов'язано з відмінностями компонентного складу термостабільних імуногенів (що слугували для отримання антисироваток) та очищених ЛПС, які використовувались як антигени в імунохімічних реакціях. Присутність денатурованих домішок та екстрацелюлярних полісахаридів в прогрітих культурах бактерій може спричиняти екранування чи модифікації антигенних властивостей їхніх ЛПС [10].

За результатами деяких дослідників [11] зміна антигенних властивостей ЛПС може обумовлюватися умовами росту бактерій. Раніше [5] нами були встановлені відмінності хімічного складу ЛПС, отриманих з клітин *R. solanacearum* 749 та 758, що культивувалися при температурах 28 °C та 37 °C, що дало можливість висунути припущення щодо втрати або укорочення у цих бактерій О-специфічного полісахариду при підвищенні температури вирощування. При порівнянні антигенних властивостей ЛПС *R. solanacearum* 758, вирощених при 28°C та 37 °C (рис. 3), в першому випадку спостерігали зміни, а саме появу третьої смуги.

В попередній роботі [6] з використанням RAPD-ПЛР методу, нами було проведено генотипування частини досліджуваних штамів, в результаті чого вони були розподілені на декілька підгруп. Штами 35 і 4, що знаходилися в окремих віддалених кластерах, і в серологічному відношенні не проявляли спорідненості, незважаючи на спільне географічне походження. Штам 35, антисироватка якого реагувала із ЛПС штаму 7954, знаходився із ним в одному кластері дендрограми.

Отримана невідповідність ставить питання щодо природи взаємозв'язку структури ЛПС бактерій із субвидовим філогенетичним положенням. Дослідники [8] запропонували класи-

фікацію методів внутрішньовидової диференціації штамів, ієрархія яких базується на рівні реалізації генетичної інформації. Методи, пов'язані із встановленням первинної структури геному, вважаються найбільш наближеними до відображення філогенетичного положення організму. На другому рівні знаходяться методи, що базуються на вивченні структури білків, на третьому – небілкових клітинних макромолекул, і на останньому – встановлення морфологічних та фізіологічних особливостей культур мікроорганізмів.

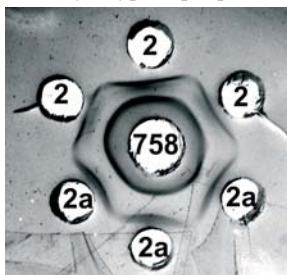


Рис. 3. Реакція подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні ЛПС *R. solanacearum* шт. 758, вирощеного при 28°C(2) і 37°C (2a) з антисироваткою до шт. *R. solanacearum* 758

Для дивергенції штамів за хемо-(серо)типами ЛПС необхідно є спрямована дія селективного фактору середовища, сила якого виходить за межі механізмів фенотипової мінливості. У випадку патогенних мікроорганізмів тварин таким фактором є імунна система, що вибірково елімінує бактерії, в залежності від антигенних та хімічних властивостей їх ЛПС. Одним із наслідків цього є чітка асоціація серотипу та особливостей біології, зокрема патогенних властивостей збудника, що і обумовлює практичне значення серотипізації в медицині. Так, утворення холерного токсину властиве лише для двох основних серотипів *Vibrio cholerae* (O1 та O139) [15]; кожен із ентеротоксигенних серотипів *Escherichia coli* має характерний профіль факторів патогенності [7], тощо. Для *R. solanacearum* кореляції між структурою О-ПС та належністю до біотипу не виявлено, окрім того структури О-ПС *R. solanacearum* та генетично віддаленого виду *Pseudomonas cichorii*, виявилися ідентичними [2].

Враховуючи те, що для фітопатогенних бактерій значення відмінностей в структурі О-полісахариду в молекулярній взаємодії із рослиною-хазяїном та адаптації до кліматичних умов досі не доведене [13], питання щодо ступеня кореляції антигенних властивостей їх ЛПС із біологічною ідентичністю залишається нез'ясованим.

Таким чином, при вивченні імунохімічних властивостей ЛПС *R. solanacearum*, шість штамів із восьми вдалося асоціювати із певною серогрупою.

Р.В. Грицай, О.С. Броварская, Н.В. Житкевич, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Резюме

Иммунохимическими исследованиями восьми штаммов *Ralstonia solanacearum* шесть штаммов было отнесено к четырем серогруппам, две из которых образованы парами штаммов *R. solanacearum* 4 и 526; 758 и 7954; две другие представлены по одному штамму – TX₁ та TS₃ соответственно. Антигенная структура О-полисахарида штамма 7954 объединяет в себе антигенные эпитопы штаммов *R. solanacearum* 4, 35, 526, 749, однако отсутствие кросреактивности не позволяет объединить их в одну серогруппу. Последнее, а также то, что антисыворотка к *R. solanacearum* шт. 749 в реакции с ЛПС шт. 526 образовывала две линии преципитации (тогда как в гомологической только одну) может быть объяснено отличиями компонентного состава термостабильных иммуногенов (которые служили для получения антисывороток), а также очищенных ЛПС, которые использовывались как антигены в иммунохимических реакциях.

Ключевые слова: *Ralstonia solanacearum*, липополисахариды, серологическая активность

SEROLOGICAL CHARACTERISTIC OF LIPOPOLYSACCHARIDES OF *RALSTONIA SOLANACEARUM*

S u m m a r y

By immunochemical investigations of eight strains of *Ralstonia solanacearum* six strains were attributed to four serogroups. Two of them are formed by pairs of *R. solanacearum* strains 4 and 526; 758 and 7954; two others are represented by single strains – TX₁ та TS₃, correspondingly. Antigenic structure of *R. solanacearum* 7954 O-polysaccharide unites antigenic epitopes of *R. solanacearum* strains 4, 35, 526, 749, however the absence of cross-reactivity does not permit uniting them into the same group. The latter, and also the fact that the antiserum to *R. solanacearum* 749 in the reaction with LPS of *R. solanacearum* 526 forms two precipitation lines (while in the homological system it forms only one line) may be explained by differences in the component composition of heat-stable immunogens (which were used for antiserum obtaining), and also purified LPS which were utilized as antigens in immunochemical reactions.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, lipopolysaccharides, serological activity.

The author's address: Gritsay R.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National of Sciences of Ukraine; 154 Acad.Zabolotny St, Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Варбанець Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методи дослідження ендотоксинів. – К.: Наук. думка, 2006. – 237 с.
2. Варбанець Л. Д., Кочарова Н. А., Книрель Ю. А., Мурас В. А., Москаленко Н. В., Броварська О. С. Липополісахариди *Pseudomonas solanacearum* и *Pseudomonas cichorii* // Мікробіол. журн. – 1999. – 52, № 4. – С. 27-33.
3. Вестфаль О., Янн К. Бактериальні ліпополісахариди // Методи дослідження вуглеводів. – М.: Мир, 1975. – С. 325–333.
4. Винарська Н.В., Варбанець Л.Д. Хімічна характеристика і серологічна активність ліпополісахаридів *Pseudomonas solanacearum* // Мікробіол. журн. – 2002 – 64, № 1. – С. 37-47.
5. Грицай Р.В., Броварська О.С., Варбанець Л.Д. Вплив температури культивування на склад ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* // Мікробіол. журн. – 2011, Т.73, №4. – С. 25-29.
6. Грицай Р.В., Варбанець Л.Д., Броварська О.С., Житкевич Н.В., Олійник Т.М. Оцінка генетичної гетерогенності штамів *Ralstonia solanacearum* на основі RAPD-ПЛІР аналізу//Мікробіологія і біотехнологія. – 2011, №2 (14). – С. 23-33.
7. Campos L. C., Franzolin M. R., Trabulsi L. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. Coli* O serogroups // R. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2004. – 99, №6. – P. 545-552.
8. Norris J.R., Goodfellow M., Board R.G. Microbial classification and identification. – London, Academic Press, 1980. – 408 p.
9. Elphinstone J. G., Hennessy J., Wilson J. K., Stead D. E. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts // Bull EPP0. – 1996. – 26, № 3-4. – P. 663-678.
10. Griep R. A., van Twisk C., van Beckhoven J. R. C. M., van der Wolf J. M., and Schots A. Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* // Bacteriology. – 1998. – 88, № 8. – P. 795-803.
11. Hendrick, C. A. Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum* / Hendrick C. A., Sequeira L // Appl Environ Microbiol. – 1984. – 48, № 1. – P. 94-101.
12. Janse J. D. Potato brown rot in western Europe – history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies // Bull. OEPP. – 1996. – 26, № 3-4. – P. 679-695.
13. Newman, Mari-Anne. Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides // J. Endotoxin Res. – 2007. – 13, №2. – P. 69-84.
14. Norman D.J., Zapata M., Gabriel D.W., Duan Y.P., Yuen J.M., Mangravita-Novo A., Donahoo R.S. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America // Phytopathology. – 2009. – 99, №.9 – P. 1070-1077.
15. Theophilos G. N., Rodrigues D. P., Leal N. C. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000 // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. – 2006. – 48, №2. – P. 65-70.
16. Vidaver A. Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescence of phytopathogenic Pseudomonads: effect of the carbon source // Appl. Microbiol. – 1967. – 15, №6. – P. 1523-1524.

Отримано 26.05.2011