



УДК 576.851.49.097+577.11

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ДЕТЕРМИНАНТОВ
О-АНТИГЕНОВ SALMONELLA СЕРОГРУППЫ E

Тендетник Ю. Я., Овчарова Н. М.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии
Министерства здравоохранения СССР, Москва

Черняк А. Я., Дмитриев Б. А.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва

Изучены антителосвязывающие свойства синтетических олигосахаридных фрагментов О-специфических полисахаридов *Salmonella* серогруппы E в гомологичных иммунных системах 3 и 10. На основании полученных результатов детерминант О-фактора 3 сформулирован как трисахарид β -D-маннопиранозил-(1 \rightarrow 4)- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 3)-D-галактоза, центральную роль в котором играет остаток рамнозы. Обнаружено, что тетрасахаридное биологическое повторяющееся звено подгруппы E₄ (факторы 1, 3, 19) обладает нейтрализующей активностью в отношении антител к фактору 10. Показано, что в формировании факторов 3 и 10 особую роль играет тип гликозидных связей между остатками сахаров.

Серологическая специфичность бактериальных соматических антигенов, выражаемая для бактерий рода *Salmonella* О-факторами схемы Кауфмана — Уайта [1], с химической точки зрения определяется структурными фрагментами специфической полисахаридной цепи липополисахарида (ЛПС) [2]. Наряду с другими приемами иммунохимического анализа, позволяющими установить роль определенных структурных элементов О-антигенного полисахарида в проявлении отдельных О-факторов, применяется использование олигосахаридов, выделяемых при частичном кислотном гидролизе полисахаридов, в качестве ингибиторов иммунной реакции в соответствующей системе «фактор — антифакторная сыворотка» [3]. Именно с помощью такого метода были получены сведения о химической природе О-факторов (детерминант) полисахаридных антигенов *Salmonella* подгрупп E₁—E₄ [3, 4], строение повторяющихся звеньев которых приведено в табл. 1.

Оценивая ингибирующую способность олигосахаридов, получаемых при частичном кислотном гидролизе полисахаридных цепей ЛПС серогруппы E (разрыв в первую очередь наиболее кислотолабильных рамнозидных связей) в системе 3 — анти-3, Роббинс и Учуда [3] пришли к выводу, что О-фактор 3 определяется β -маннозилрамнозным фрагментом, так как по своей ингибирующей активности дисахарид β -маннозилрамноза оказался идентичным трисахаридам β - и α -галактозил-(1 \rightarrow 6)-маннозилрамнозе, а дисахарид α -маннозилрамноза, выделенный при частичном гидролизе ЛПС *S. typhimurium* (факторы 4, 5, 12), не проявлял ингибирующей активности. Совершенно очевидно, что путем гидролитического расщепления бактериальных полисахаридов можно получить только огра-

Структура биологических повторяющихся звеньев специфических полисахаридов *Salmonella* серогруппы E* [2]

Подгруппа (O-факторы)	Биологическое повторяющееся звено
E ₁ <i>S. anatum</i> (3, 40)	→ 6Manβ1 → 4Rhaα1 → 3Gal(OAc)α1 →
E ₂ <i>S. newington</i> (3, 15)	→ 6Manβ1 → 4Rhaα1 → 3Galβ1 →
E ₃ <i>S. illinois</i> (3, 15, 34)	→ 6Manβ1 → 4Rhaα1 → 3Gal(4 ← 1αGlc)β1 →
E ₄ <i>S. senftenberg</i> (1, 3, 19)	→ 6Manβ1 → 4Rhaα1 → 3Gal(6 ← 1αGlc)α1

* Здесь и в табл. 3 остатки Man, Gal, Glc — D-, Rha — L-конфигурации.

Оценка чувствительности и специфичности реакции ингибирования пассивной гемагглютинации

Антиген-ингибитор	Минимальная нейтрализующая доза антигена (в мкг) в иммунной системе				
	эритроциты, покрытые ЛПС	сыворотки (рецепторы)			
		3,10	10	4	9
ЛПС <i>S. anatum</i>	<i>S. anatum</i>	0,003	0,00005	—	—
	<i>S. typhimurium</i>	—	—	—	—
	<i>S. typhi</i>	—	—	—	—
ЛПС <i>S. typhimurium</i>	<i>S. anatum</i>	—	—	—	—
	<i>S. typhimurium</i>	—	—	0,003	—
	<i>S. typhi</i>	—	—	—	—
ЛПС <i>S. typhi</i>	<i>S. anatum</i>	—	—	—	—
	<i>S. typhimurium</i>	—	—	—	—
	<i>S. typhi</i>	—	—	—	0,006

ниченное число олигосахаридов, тогда как для иммунохимического анализа необходимо иметь полный набор олигосахаридов, моделирующих все структурные элементы изучаемого антигенного полисахарида, и даже структурно измененные аналоги этих олигосахаридов.

В последние годы в лаборатории химии углеводов Института органической химии АН СССР (Москва) в результате целенаправленного синтеза был получен ряд олигосахаридных фрагментов O-специфических полисахаридов *Salmonella* серогруппы E, в том числе биологические повторяющиеся звенья полисахаридов подгрупп E₂ [5] и E₄ [6] и их неприродные аналоги. В настоящем сообщении приводятся результаты детального серологического исследования полученных синтетических олигосахаридов с точно установленной структурой.

Для оценки серологической активности олигосахаридов была использована реакция ингибирования пассивной гемагглютинации ввиду ее высокой чувствительности, специфичности и относительной простоты выполнения в стандартных условиях [7]. В табл. 2 приведены полученные нами данные о специфичности и чувствительности этого метода анализа на уровне чистых соматических антигенов.

Из приведенных в табл. 2 данных следует, что в гомологичных иммунных системах удается выявить тысячные доли микрограмма соответствующего ЛПС, а в гетерологичных системах феномена ингибирования не наблюдалось при использовании 100—200 мкг ЛПС. В системе «эритроциты, покрытые ЛПС *S. anatum*, + иммунная монофакторная сыворотка анти-10» удалось выявить чрезвычайно малые количества гомологичного антигена (0,00005 мкг), что, по-видимому, обусловлено особенностями химического строения данного детерминанта. Таким образом, было экспери-

Антителонейтрализующая активность антигенов и олигосахаридов
Salmonella серогруппы E

Препараты	Минимальная нейтрализующая доза препарата (в мкг) в иммунной системе «эритроциты, покрытые ЛПС <i>S. anatum</i> , и сыворотки»		
	3,19	3,10	10
ЛПС <i>S. anatum</i>	0,003	0,006	0,00005
Продукты гидролитического расщепления ЛПС <i>S. anatum</i>			
Полисахарид	0,025	0,012	0,00005
Полисахарид после дезацетилирования триэтиламином	0,025	0,025	0,05
Высшие олигосахариды	0,02	0,02	1,56
Додекасахариды	0,8	0,8	6,25
Нонасахариды	0,8	0,8	12,5
Гексасахариды	0,8	0,8	25
Трисахариды	3,12	3,12	50
Синтетические олигосахариды			
Man β 1 \rightarrow 4Rha α 1 \rightarrow 3Gal (I)	0,8	0,4	25
Man β 1 \rightarrow 4Rha α 1-OMe (II)	3,12	1,56	—
Man β 1 \rightarrow 4Rha (III)	12,5	6,25	—
Glc β 1 \rightarrow 4Rha α 1 \rightarrow 3Gal (IV)	6,25	6,25	25
Glc β 1 \rightarrow 4Rha (V)	25	25	—
Man β 1 \rightarrow 4Rha α 1 \rightarrow 3Gal (6 \leftarrow 1 α Glc) (VI)	0,8	0,8	25
Man β 1 \rightarrow 4Rha β 1 \rightarrow 3Gal (6 \leftarrow 1 α Glc) (VII)	12,5	12,5	100
Man α 1 \rightarrow 4Rha α 1 \rightarrow 3Gal (6 \leftarrow 1 α Glc) (VIII)	100	100	50
Glc β 1 \rightarrow 4Rha α 1 \rightarrow 3Gal (6 \leftarrow 1 α Glc) (IX)	6,25	6,25	50
Glc β 1 \rightarrow 4Rha β 1 \rightarrow 3Gal (6 \leftarrow 1 α Glc) (X)	50	50	50
Rha α 1 \rightarrow 3Gal β 1-SMe (XI)	185	185	25
Man β 1-OMe (XII)	125	125	—
Man α 1-OMe (XIII)	—	—	—

ментально показано, что используемая реакция ингибирования пассивной геагглютинации высокочувствительна и специфична.

Результаты испытания антителонейтрализующей активности синтетических олигосахаридов рассмотрены ниже. Предварительно, чтобы получить количественное представление о дозах природных олигосахаридов, ингибирующих на 100% геагглютинацию в гомологичных иммунных системах, осуществляли гидролитическое расщепление ЛПС *S. anatum* и проверяли серологическую активность выделенных при этом фрагментов (см. табл. 3).

Необходимо отметить падение серологической активности при переходе от ЛПС к полисахаридам и далее к олигосахаридным фрагментам. Обращает на себя внимание также одинаковая ингибирующая способность додека-, нона- и гексасахаридной фракции в системе 3 — анти-3 и уменьшение ее в 4 раза при переходе к трисахариду.

Из синтетических олигосахаридов наибольшей антителонейтрализующей способностью в отношении сывороток анти-3,19 и анти-3,10 обладали трисахарид (I) и тетрасахарид (VI), представляющие собой биологические повторяющиеся звенья специфических полисахаридов подгрупп E₂ и E₄. Активность маннозилрамнозных дисахаридов (II) и (III) была заметно меньше, причем из этих двух дисахаридов антителонейтрализующие свойства были более выражены (примерно в 4 раза) у препарата (II), содержащего фиксированную α -рамнозидную связь. Замена маннозы на глюкозу в ди-, три- и тетрасахаридных аналогах (IV), (V), (IX) и (X) привела к некоторому снижению нейтрализующей активности этих олигосахаридов в отношении антител к фактору 3. Однако еще большее уменьшение серологической активности гаптенов наблюдалось при изменении конфигурации связей между моносахаридными остатками: β -кон-

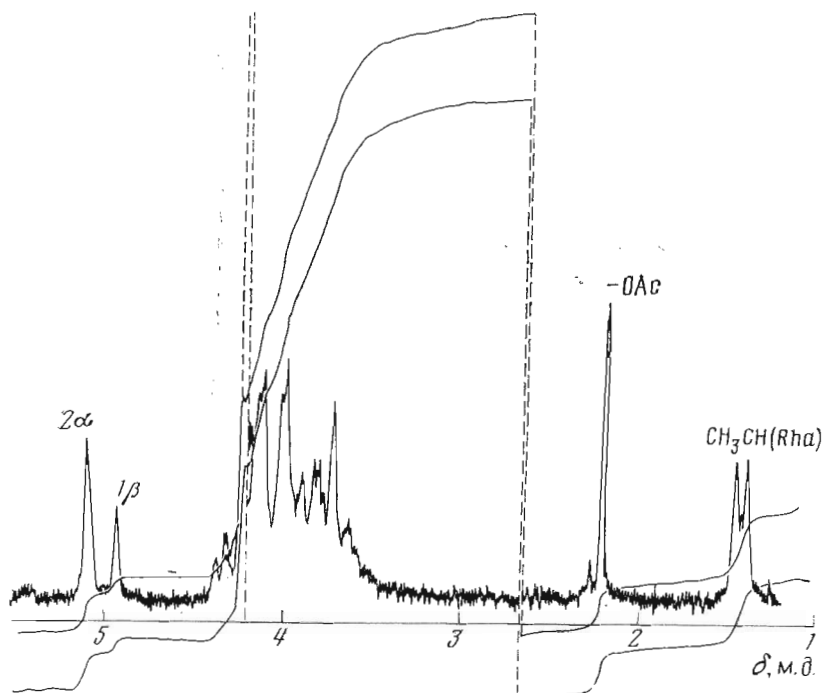
фигурации гликозидной связи между маннозой и рамнозой на α -связь (олигосахарид (VIII)) и α -связи между рамнозой и галактозой на β -связь (тетрасахариды (VI) и (VII)). Рамнозилгалактозный дисахарид (XI) и β -метил-*D*-маннопиранозид (XII) проявляли весьма слабовыраженную серологическую активность, а α -метил-*D*-маннопиранозид был полностью ее лишен в использованной концентрации.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что О-фактором 3 специфических полисахаридов серогруппы E бактерий рода *Salmonella* является трисахарид β -*D*-маннопиранозил-(1 \rightarrow 4)- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 3)-*D*-галактоза, так как наиболее сильную нейтрализующую активность в отношении анти-3 антисыворотки проявляли олигосахариды (I) и (VI), соответствующие биологическим повторяющимся звеньям подгрупп E₂ и E₄. Подобная трактовка фактора 3 существенно дополняет вывод, сделанный Роббинсом и Учидой [3], так как доказывает важность α -рамнозидной связи как одного из структурных элементов, формирующих этот фактор. Сделанный вывод подтверждается также тем, что трисахаридный препарат, полученный путем гидролитического расщепления ЛПС *S. anatum*, обладал меньшей серологической активностью, чем синтетический трисахарид (I), и ингибировал реакцию пассивной геммагглютинации примерно в такой же степени, как и синтетический дисахарид (II) с невозстанавливающей рамнозой. В то же время природные додека-, нона- и гексасахариды по своей серологической активности были практически идентичны трисахариду (I).

Результаты серологических испытаний широкого набора олигосахаридов, представленные в табл. 3, позволили обнаружить и детализировать структурные элементы, наиболее существенные для проявления фактора 3. Так, из приведенных данных следует, что нарушение конфигурации α -рамнозидной и β -маннозидной связей резко снижает антителосвязывающую способность изученных аналогов. Серологическая активность падает при переходе от α -связанной рамнозы к восстанавливающей и β -связанной рамнозе. Еще более сильный эффект наблюдается при замене β -маннозидной связи на α -маннозидную.

Замена β -*D*-маннозного остатка на остаток β -*D*-глюкозы в аналогах (IV), (V), (IX) и (X) приводит к менее резкому снижению серологической активности, чем изменение конфигурации гликозидных связей. Видимо, вносимые при такой замене структурные нарушения не препятствуют в значительной степени взаимодействию остальной части олигосахаридной молекулы с участком связывания в антителах, вырабатываемых против фактора 3. Частичное сохранение специфичности фактора 3 при переходе от биологического повторяющегося звена подгруппы E₂ (трисахарид (I)) к его глюкозному аналогу (IV) было также продемонстрировано нами ранее [8] при иммунологических испытаниях искусственных антигенов, приготовленных на основе этих трисахаридов. В то же время, как было показано Кляйнхаммером и др. [9], существенная модификация остатка рамнозы в химическом повторяющемся звене *S. illinois* при включении ее во флавозольную систему для ковалентного связывания с эдстином приводит к полной потере способности искусственного антигена вызывать образование антител к фактору 3 при иммунизации кроликов. Наконец, следует отметить, что наличие тех или иных заместителей (О-ацетильная группа или остаток α -*D*-глюкозы) в различных положениях остатка галактозы (подгруппы E₁, E₃ и E₄) не меняет активности фактора 3.

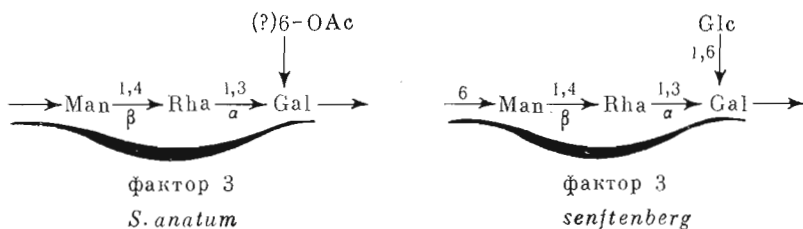
Таким образом, полученные нами экспериментальные данные и вышеизложенные соображения позволяют включить в первоначально сформулированную структуру фактора 3 [3, 4] α -рамнозидную связь с остатком галактозы и определить фактор 3 как трисахарид β -*D*-маннопиранозил-(1 \rightarrow 4)- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 3)-*D*-галактозу, центральную роль в котором играет остаток рамнозы. Наиболее важными структурными элемен-



Спектр ПМР специфического полисахарида *S. anatum*

тами, обуславливающими необходимую конформацию трисахаридного звена, являются конфигурации обеих гликозидных связей, соединяющих остаток рамнозы с остатками маннозы и галактозы (см. схему 1; толщина дуги отражает относительный вклад структурной единицы олигосахарида в интенсивность взаимодействия с антигеном).

С х е м а 1



В табл. 3 включены данные о проверке агглютинирующей способности синтетических олигосахаридов в отношении монофакторной сыворотки анти-10. Роббинс и Учида [3] обнаружили, что ЛПС *S. anatum* (факторы 3, 10) содержит О-ацетильную группу, и показали, что иммунодоминантным сахаром щелочлабильного фактора 10 является скорее всего 6-О-ацетилгалактозный остаток. С другой стороны, по данным Хеллерквиста с сотр. [10], ЛПС *S. muenster* (факторы 3, 10), также относящейся к подгруппе E₁, не содержит О-ацетильных групп, тем не менее для интактных бактериальных клеток было показано наличие фактора 10. Противоречивость этих данных свидетельствует о недостаточной изученности химической природы фактора 10 *Salmonella*.

Используя независимый физико-химический метод (съёмка спектра ПМР в D₂O), мы показали, что специфический полисахарид, выделенный из ЛПС *S. anatum*, содержит О-ацетильные группы (рисунок). Соотноше-

ние интегральных интенсивностей сигналов О-ацетатов и С-метильной группы рамнозы равно 0,75. Это означает, что каждые 3 из 4 повторяющихся звеньев полисахаридной цепи несут О-ацетильные группы. По данным [3], полученным при определении О-ацетильных групп в виде ацетилгидроксамовой кислоты, в ЛПС *S. anatum* на один остаток рамнозы приходится 0,54—0,57 ацетильных групп. После дезацетилирования водным триэтиламиноом, по нашим данным, полисахарид резко (в 1000 раз) снижал свою ингибирующую активность по отношению к сыворотке анти-10, но все же 0,05 мкг дезацетилированного полисахарида ингибировали реакцию гемагглютинации.

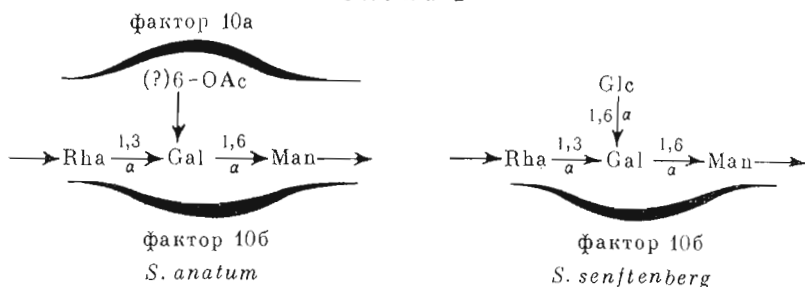
Из данных табл. 3 следует, что олигосахариды, полученные частичным гидролизом специфического полисахарида *S. anatum* и, скорее всего, не несущие О-ацетильных групп, а также синтетические олигосахариды, имеющие в своем составе галактозу, обладают определенной нейтрализующей активностью в отношении антител к фактору 10. Ингибирующие свойства обнаружил также рамнозилгалактозный дисахарид (XI), тогда как маннозил- и глюкозилрамнозные дисахариды (III) и (V) не были способны связываться с антителами к детерминанту 10. Полученные данные подтверждают вывод Роббинса и Учиды [3] об иммунодоминантной роли О-ацетил-*D*-галактозы в формировании фактора 10 серогруппы E. *Salmonella* и вместе с тем ставят вопрос о необходимости уточнения детерминантного участка этого фактора.

Детерминант 10 формулируется Роббинсом и Учидой как трисахарид 6-О-ацетил- α -*D*-галактопиранозил-(1→6)-маннозилрамноза. Однако результаты серологических испытаний синтетических олигосахаридов свидетельствуют об определенной роли в проявлении фактора 10 типа гликозидной связи между остатками галактозы и рамнозы. Замена α -рамнозидной связи на β -рамнозидную (тетрасахариды (VI) и (VII)) в 4 раза снижала нейтрализующую способность в отношении антител анти-10. С другой стороны, трисахарид, выделенный из частичного гидролизата О-антигенного полисахарида *S. anatum* и содержащий, согласно [3], α -*D*-галактопиранозидную связь, проявляет приблизительно ту же антителонейтрализующую активность в отношении монофакторной сыворотки 10, что и синтетические олигосахариды с восстанавливающей галактозой. Наконец, по данным [3], изменение конфигурации α -галактозидной связи в частично ацетилированной галактозил-(1→6)-маннозилрамнозе на β -конфигурацию резко снижает ингибирующую способность этого трисахарид в системе анти-10.

Перечисленные факты позволяют предположить, что детерминантом фактора 10 *Salmonella* является трисахарид α -*L*-рамнопиранозил-(1→3)-(6-О-ацетил- α -*D*-галактопиранозил)-(1→6)-*D*-манноза, причем конфигурации обеих гликозидных связей играют важную роль. Строгое подтверждение этого предположения и окончательное выяснение структуры детерминантного участка фактора 10 возможно, однако, при дополнительном изучении серологических свойств олигосахаридов, в которых остаток *D*-галактозы (и 6-О-ацетил-*D*-галактозы) занимал бы не только концевое, но и центральное положение. Естественно, что получение такого набора олигосахаридов возможно только путем целенаправленного химического (или биохимического) синтеза.

Следует отметить, что ингибирующую активность в отношении антител к фактору 10 наряду с трисахаридами проявили тетрасахариды (VI) — (X), несущие разветвление по положению 6 в остатках галактозы, т. е. в месте предполагаемого расположения О-ацетильных групп в специфическом полисахариде *S. anatum*. Вполне вероятно, что этот факт можно объяснить исходя из выдвинутого Стоб [11] предположения о существовании субпопуляций антител (в данном случае анти-10-антител), ориентированных к иммунодоминантному участку полисахарида с двух различных сторон, как показано на схеме 2. Доводом в пользу такого объяснения

С х е м а 2



могло бы быть обнаружение слабой перекрестной серологической реакции между ЛПС или специфическим полисахаридом *S. senftenberg* и монофакторной сывороткой анти-10.

Экспериментальная часть

В серологических испытаниях были использованы α -метил-*D*-маннопиранозид (Chemapol, СССР), β -метил-*D*-маннопиранозид [12] и олигосахариды, приведенные в табл. 3, синтез которых был описан в следующих работах: (I), (III) — [5], (II) — [13], (IV) — [14], (V) — [15], (VI) — (VIII) — [6], (IX), (X) — [16], (XI) — [17].

Штаммы бактерий. В работе были использованы *S. anatum*, *S. senftenberg*, *S. newington*, *S. minnesota*, *S. typhimurium*, *S. abortus-equi* и *S. typhi* 0901, полученные из Международного центра по сальмонеллам в Париже через Государственный институт контроля и стандартизации медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Все штаммы находились в *S*-форме и хранились в ампулах в лиофилизированном виде. Перед опытом штаммы высевали в бульон Хоттингера и через 3—4 ч роста при 37° С — на агар Хоттингера в чашках Петри. Посевы инкубировали при 37° С в течение 18—20 ч, после чего типичные колонии отсеивали на скошенный агар Хоттингера в пробирках, инкубировали при 37° С в течение ночи и проверяли антигенную специфичность с помощью коммерческих абсорбированных сывороток, а также ферментативные свойства.

Антигены. Бактериальную массу для выделения антигенов получали путем выращивания соответствующего штамма на плотной питательной среде в реакторе АКМШ*. Сухие клетки экстрагировали 45% водным фенолом, нуклеиновые кислоты осаждали цетавлопом, а ЛПС переосаждали спиртом из раствора хлористого натрия по стандартной методике [18]. Таким образом были выделены чистые ЛПС *S. anatum*, *S. typhimurium* и *S. typhi* 0901.

Гидролитическое расщепление ЛПС *S. anatum*. ЛПС был деградирован 1% уксусной кислотой в течение 1,5 ч при 100° С. Из углеводной части хроматографией на сефадексе G-50 (колонка 3,5×70 см, элюент — пиридин-ацетатный буфер, рН 4,5, скорость элюирования 60 мл/ч) был выделен O-специфический полисахарид. В гидролизате полисахарида (2 М HCl, 100° С, 4 ч) с помощью анализатора углеводов Technicon SC-2 (США) были обнаружены рамноза, галактоза и манноза в соотношении 1 : 1 : 1 и следы глюкозы. Спектр ПМР полисахарида получен на приборе Varian XL-100 в D₂O при 90° С с предварительной лиофилизацией образца из D₂O. Полисахарид был подвергнут частичному кислотному гидролизу (0,1 н. HCl, 100° С, 30 мин), гидролизат после упаривания и высушивания в вакууме над едким натром фракционировали на биогеле Р-2 (колонка 2,5×100 см, элюент — вода при 70° С, скорость элюции 60 мл/ч). Выходная кривая строилась с помощью анализатора углеводов. Фракции гекса- и

* Аппарат культивирования микробов Шестеренко.

трисахаридов, гомогенные по данным хроматографии на бумаге в системе этилацетат — CH_3COOH — HCOOH — вода, 18 : 3 : 1 : 4, содержали рамнозу, галактозу и маннозу в соотношении 1 : 1 : 1.

Деацетилирование специфического полисахарида S. anatum. К раствору 50 мг полисахарида *S. anatum* в 10 мл воды добавляли 0,1 мл триэтиламина и нагревали 10 мин при 60° С. После охлаждения с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50 в описанных выше условиях выделяли деацетилированный полисахарид. По данным [49], описанная процедура омыления приводит к полному удалению О-ацетильных групп.

Иммунные сыворотки. С целью приготовления антисывороток кроликов иммунизировали 6-кратно с интервалами в 5—7 сут формализированными и трижды отмытыми физиологическим раствором вакцинами из *S. anatum*, *S. senftenberg*, *S. newington*, *S. abortus-equi*, *S. typhimurium* и *S. typhi* (первые две инъекции подкожно по 1 млрд. микробных клеток, последующие внутривенно — по 2 млрд. клеток). Через 3 недели после окончания цикла иммунизации кроликам вновь вводили внутривенно по 2 млрд. микробных клеток для получения бустер-эффекта и через неделю обескровливали, получали сыворотку отдельно от каждого кролика, прогревали ее 30 мин при 56° С и проверяли в реакциях гемагглютинации и преципитации. Высокоактивные и специфичные сыворотки разливали по 1 мл в ампулы и лиофилизовали. Таким образом были получены сыворотки 3,10; 1,3,19; 3,15; 1,4,5,12; 4,12 и 9,12.

Монофакторные сыворотки получали следующим образом. Цельные или разведенные в соотношении 1 : 5 иммунные сыворотки приливали к осадку формализированных и отмытых бактерий из расчета примерно 500 мг влажных клеток на 1 мл. Пробирки встряхивали и помещали в холодильник при 4° С на сутки, после чего суспензию центрифугировали и использовали надосадок. При необходимости процедуру адсорбции повторяли. Антисыворотку 10 приготавливали путем адсорбции иммунной сыворотки 3,10 бактериальными клетками *S. senftenberg*, *S. minnesota* и *S. typhi* 0901. Антисыворотку 9 получали в результате адсорбции иммунной сыворотки 9,12 клетками *S. typhimurium*, антисыворотку 4 — из иммунной сыворотки 4,12 адсорбцией *S. typhi* 0901. Монофакторные сыворотки проверяли в реакциях агглютинации и преципитации и затем лиофилизовали.

Реакция нейтрализации антигел. Для оценки серологической активности олигосахаридов была использована реакция ингибирования пассивной гемагглютинации [7]. Иммунными системами служили формализированные эритроциты барана, покрытые ЛПС из различных штаммов *Salmonella* (*S. anatum*, *S. typhimurium* и *S. typhi*), и соответствующие иммунные сыворотки (3,10; 3,19) и монофакторные (4,9; 10). В качестве ингибиторов использовали гомологичные и гетерологичные ЛПС, полисахариды и олигосахариды, определенную навеску (от 1 до 4 мг) которых растворяли в 1 мл физиологического раствора. Реакцию ставили в микропластинах титратора «Такачи» (Венгрия). К пробам по 0,05 мл раствора антигена с различными разведениями добавляли 0,05 мл иммунной сыворотки в постоянной концентрации, соответствующей 1 гемагглютинирующей единице. После выдерживания в течение 30 мин при 20° С в каждую лунку вносили 0,025 мл 0,3%-ной взвеси эритроцитов, покрытых определенным ЛПС. Результаты учитывали через 2—3 ч или на следующий день. С целью стандартизации условий постановки реакции в каждом опыте дополнительно использовали одну и ту же иммунную систему с постоянными сериями соответствующих ингредиентов (ЛПС, иммунные сыворотки и эритроциты, покрытые ЛПС).

Авторы признательны Н. Н. Малышевой, В. И. Торгову и А. В. Николаеву за предоставление образцов синтетических олигосахаридов и Ю. А. Книрелю за выделение и деградацию специфического полисахарида *S. anatum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kauffmann F. (1961) Die Bakteriologie der Salmonella Species, Munksgaard, Copenhagen.
2. Jann K., Westphal O. (1975) in: The Antigens, Microbial Polysaccharides, vol. III, pp. 1-125.
3. Uchida T., Robbins P. W., Luria S. E. (1963) Biochemistry, 2, 663-668.
4. Robbins P. W., Uchida T. (1965) J. Biol. Chem., 240, 375-383.
5. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Николаев А. В. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2578-2581.
6. Kochetkov N. K., Malysheva N. N., Torgov V. I., Klimov E. M. (1977) Carbohydr. Res., 54, 269-274.
7. Тендетник Ю. Я., Овчарова Н. М. (1978) Ж. микробиол., № 4, 37-41.
8. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Покровский В. И., Тендетник Ю. Я. (1979) Биоорган. химия, 5, 217-226.
9. Kleihammer G., Himmelspach K., Westphal O. (1973) Eur. J. Immunol., 3, 834-838.
10. Hellerqvist C. G., Lindberg B., Lönngren J., Lindberg A. A. (1971) Carbohydr. Res., 16, 289-296.
11. Lüderitz O., Westphal O., Staub A. M., Nikaido H. (1971) in: Microbial Toxins (Weinbaum G., Kadis S., Aji S. J., eds), vol. IV, p. 180, Acad. Press, N. Y.
12. Bott H. G., Haworth W. N., Hirst E. L. (1930) J. Chem. Soc., 2653-2659.
13. Bebault G. M., Dutton G. G. S. (1974) Carbohydr. Res., 37, 309-319.
14. Кочетков Н. К., Дмитриев Б. А., Николаев А. В., Байрамова Н. Э. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1609-1613.
15. Bebault G. M., Dutton G. G. S. (1972) Can. J. Chem., 50, 3373-3379.
16. Кочетков Н. К., Малышева Н. Н., Торгов В. И., Климов Е. М. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 654-658.
17. Дмитриев Б. А., Черняк А. Я., Байрамова Н. Э. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 142-148.
18. Westphal O., Jann K. (1965) in: Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler R. L., Wolfrom M. L., eds), vol. 5, pp. 83-91, Acad. Press, New York - London.
19. Дмитриев Б. А., Книрсель Ю. А., Випоградов Е. В., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1978) Биоорган. химия, 4, 40-46.

Поступила в редакцию
12.VII.1979

IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF SEVERAL DETERMINANTS OF THE SALMONELLA O-ANTIGENS OF THE SEROGROUP E

TENDETNIK Yu. Ya., OVCHAROVA N. M., CHERNYAK A. Ya., DMITRIEV B. A.

*Central Research Institute on Epidemiology, Ministry of Health
of the USSR, Moscow; N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The antibody binding by synthetic oligosaccharide fragments of the Salmonella O-specific polysaccharides of the serogroup E has been investigated with the homologous immune systems 3 and 10. As a result the O-factor 3 determinant is formulated as a trisaccharide, β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-D-galactose, where in the rhamnose residue plays a central role. The tetrasaccharide biological repeating unit of subgroup E₄ (factors 1, 3, 19) is found to harbour the neutralizing activity towards the antibodies to the factor 10. The type of glycoside bonds between sugar residues is shown to be of importance in the formation of factors 3 and 10.