

УДК 576.851

## МОНОЗОНАЛЬНІ АНТИЕНТЕРОТОКСИЧНІ СИРОВАТКИ ДО СТАФІЛОКОКОВИХ ЕКЗОТОКСИНІВ

Петросова В.І., Петросов К.О., Білкей М.В., Волошин Я.А.

**Монозональні антиентеротоксичні сироватки до стафілококових екзотоксинів.- В.І. Петросова, К.О. Петросов, М.В. Білкей, Я.А. Волошин** - Препарати ентеротоксинів вводили щотижня до 15 ін'єкцій з ад'ювантом Фрейнда, крім того в одній з схем в даній серії дослідів останні чотири ін'єкції вводили без ад'юванта, однак у цьому випадку спостерігали незначне зростання титру Іg. Особливо характерно таке положення було при імунізації лабораторних тварин серотипами D і E, що давало наявність перехресних реакцій з ентеротоксином серотипу А. Використання ад'юванта Фрейнда дозволяло уникнути цього небажаного явища і отримати високоактивні монозональні антиентеротоксичні сироватки до всіх серотипів стафілококових ентеротоксинів. Проведені дослідження з випробування різних схем імунізації дозволили зробити висновок про стимулюючий ефект повного ад'юванта Фрейнда - введення даного інгредієнту в будь-якій схемі імунізації дозволяло отримати підвищення титрів Іg в 1,5-2 рази.

**Ключові слова:** *Staphylococcus*, ентеротоксини, схеми імунізації, сироватки, антитіла, ад'ювант, лабораторні тварини

**Адреса:** Ужгородський національний університет, вул. Волошина, 32, м. Ужгород, 88000, E-mail bio@uzhgorod.

**Monozonal anti-enter toxin serum to staphylococcal enter toxins.- V.I. Petrosova, K.O. Petrosov, M.V. Bilko, I. A. Voloshin** -Enter toxins preparations were administered weekly up to 15 injections with Freund's adjuvant, except in one of the variants in this series of experiments, when last four injections were administered without adjuvant, but in this case we observed slight increase in titer of Ig. This situation was observed for immunization of laboratory animals serotypes D and E, which allowed the presence of cross-reactions with enter toxins of serotype A. To avoid this undesirable phenomenon and to obtain highly monozonal anti-serum to all enter toxigenic serotypes of staphylococcal enter toxins, the use of Freund's adjuvant is possible. Our testing of different schemes of immunization led to the conclusion about stimulation effect of complete Freund's adjuvant. The injections of this ingredient in any scheme of immunization resulted in titer rise by 1.5-2times.

**Keywords:** *Staphylococcus*, enterotoxin, circuit of immunization, serum, antibodies, adjuvant, laboratory animals.

**Address:** Uzhgorod National University, 32, Voloshyna str., Uzhgorod, 88000; bio@uzhgorod.

### Вступ

Інтенсивна дослідницька робота з вивчення нових імунологічних типів ентеротоксинів розширилася повсюдно після почастішання випадків харчових отруень стафілококової етіології. Протягом останніх десятиліть накопичився великий матеріал, який свідчить про значне поширення, більше того - повсюдне зростання, кількості стафілококових захворювань, в тому числі спалахів харчових отруень стафілококової етіології [1,5,9,15,16]. Вивчення ентеротоксинів, зокрема стафілококових (СЕ), має важливе значення для визначення ролі мікробіологічних процесів у патогенезі інфекційних захворювань і імунопатологічних станів. Однак, необхідною умовою серотипування та вивчення ентеротоксинів є отримання специфічних антитоксичних сироваток

[4,8,10]. Труднощі вирішення цього питання полягають в необхідності отримання очищених препаратів ентеротоксинів. Перші специфічні сироватки були отримані шляхом імунізації кроликів, однак і інші тварини (мави чи коні) також можуть бути використані для цих цілей. В лабораторії Bergdoll застосовували цикл з 16 ін'єкцій: перші 8 ін'єкцій ентеротоксину інкубували в 0,4 % формаліні при 30°C протягом 18 днів; наступні 8 ін'єкцій - з необробленими препаратами ентеротоксину [11]. Перші серії токсичних препаратів вводили з ад'ювантом Фрейнда внутрішньом'язово, а решта без нього. Пізніше описану схему імунізації замінили серією внутрішньом'язових введень ентеротоксину (без попередньої обробки формаліном) з повним ад'ювантом Фрейнда. Отримання типових специфічних моновалентних сироваток відкрило

можливості широкого використання їх у різноманітних серологічних реакціях [3,9,12]

Описано декілька способів імунізації тварин для отримання антисироваток проти стафілококових ентеротоксинів, але більшість з них мають ряд істотних недоліків, серед яких можна відзначити високий відсоток загибелі піддослідних тварин, низькі титри антитіл, використання дорогих матеріалів тощо. Доведено, що імунізація неочищеними препаратами ентеротоксинів швидше призводить до накопичення антитіл до гемолізину, ніж до ентеротоксинів [5,11]. На початку, коли були зроблені спроби очистки стафілококових препаратів ентеротоксинів, природно виникло прагнення використовувати їх у нативному вигляді для імунізації кроликів [16,17]. Однак, в очищеному вигляді SE виявилися надзвичайно токсичними і навіть у мінімальних дозах викликали загибель тварин. За аналогії з іншими бактеріальними білковими токсинами були зроблені спроби використання їх для отримання анатоксинів. Результати цих досліджень показали, що формалізація не тільки інактивувала SE, але й призводила до втрати антигенних і імуногенних властивостей. Найбільш істотним показником цих досліджень стало те, що при введенні великих доз інактивованих формаліном препаратів ентеротоксинів, можна отримати певне підвищення резистентності тварин до ентеротоксину.

### Матеріали і методи

В основному імунізація проводилась на кроликах породи Шиншила, хоча як показали дослідження, можна використовувати й інші види тварин. Широке застосування для ідентифікації серотипів SE знайшли гелідифузійні методи преципітації, а в залежності від мети досліджень, використовували реакції *Oudin, Oakley, Fulthorpe, Ouchterlony* або їх модифікації [2, 6]. За даними ряду авторів, мікрометод на склі є найбільш придатним для виявлення дуже малих кількостей ентеротоксинів в екстрактах харчових продуктів і фільтратах бактеріальних культур [7, 13].

### Результати дослідження

Здатність підвищувати резистентність імунованих формалінованими препаратами тварин була використана нами в деяких схемах імунізації для первинних ін'єкцій. Це створювало можливість подальшого введення великих доз ентеротоксинів. Для отримання анти сироваток з високим титром антитіл було використано кілька методів, а також різних видів лабораторних тварин. Низькі молекулярні маси стафілококових ентеротоксинів обумовлювали певні труднощі в процесах виготовлення і отримання ентеротоксичних сироваток. Попередні дослід-

ження, проведені нами, визначили необхідність ретельного добору тварин для імунізації [5,6]. Навіть використання однакової схеми імунізації у різних тварин давало різницю як в титрах сироваток, так і реакціях тварин на внутрішньо м'язові введення. Низький титр антисироваток від деяких морських свинок не дав можливості використовувати їх в експерименті. Внутрішньовенні введення ентеротоксину викликали у лабораторних тварин появу судом і прояви синдрому токсичного шоку. Тому імунізацію кроликів серотипами С і Д проводили шляхом внутрішньом'язових ін'єкцій в задню лапу. Порівняльне вивчення методом антитільних ентеротоксичних діагностиків визначило наявність перехресних реакцій між серотипами А і Д, В і С при використанні сироваток з низькими титрами антитіл 1:18 і 1:32. Дослідження показали, що імунізація нативними, не остаточно очищеними ентеротоксинами, дає не менш хороші показники зростання титрів антитіл за умови тривалої імунізації тварин як очищеними, так і формалінованими препаратами ентеротоксинів [14].

На початку досліджень ми працювали з очищеними і частково очищеними препаратами ентеротоксинів А, В, С, Д, Е, отриманими нами з лабораторії проф. *Bergdoll* (США). Імунізація була проведена за чотирма схемами. Ентеротоксини А, В, С, Д, Е, призначені для імунізації, розводили фізіологічним розчином і зберігали на протязі всього циклу імунізації. Перед початком імунізації у всіх піддослідних кролів проводили забір крові з вухної вени і сироватку вивчали на присутність антитіл проти всіх п'яти серотипів ентеротоксинів методом мікропреципітації на предметних стеклах. Для цього використовували розчини ентеротоксинів, які містили в 1 мл 10 мкг токсину певного серотипу. Результати проведених нами попередніх досліджень свідчили, що метод імунізації очищеними неформалінованими препаратами не поступається схемам імунізації, які включають частину ін'єкцій формол препаратів. Перевага використання неформалінованих препаратів SE полягала в тому, що відпадала необхідність штучного ускладнення процедури імунізації, тобто отримання формалінованих препаратів ентеротоксинів, які потребували специфічних досліджень з визначення імуногенних, преципітаційних властивостей та залишкової токсичності.

Слід враховувати, що токсичність очищених препаратів ентеротоксинів вимагала обережного застосування, особливо при введенні початкових доз. Нам здалося необхідним випробувати ступінь токсичності наявних очищених препаратів ентеротоксинів на деяких лабораторних тваринах. При цьому найбільш істотним було визначення

мінімальних доз, придатних для введення кроликам при перших ін'єкціях для імунізації.

В проведеній серії дослідів ми вивчали чутливість лабораторних тварин (морських свинок, білих мишей, кроликів) до очищених препаратів ентеротоксинів. Тваринам вводили внутрішньом'язово різні дози ентеротоксинів від 0,5 мкг до 10 мкг. У досліді було взято 25 кролів породи Шиншила, 25 білих мишей і 25 морських свинок. Результати дозволили констатувати, що найбільш чутливими до СЕ різних серотипів виявилися кролі. При введенні 3-3,5 мкг ентеротоксинів А і Д серотипів загинули всі піддослідні кролі, в той час як В і С викликали менш токсичну дію, однак введення 1 мкг ентеротоксинів В і С серотипів викликали стрімку (250-300 г) втрату маси тіла. Згідно з даними, отриманими в процесі проведення досліджень, найбільш токсичними для кроликів виявилися серотипи ентеротоксинів А і В, ентеротоксини серотипів Д і С виявляли менш токсичну дію.

Проведення подальших досліджень з вивчення чутливості лабораторних тварин до стафілококових ентеротоксинів дозволили встановити мінімальні дози, які викликали загибель кролів через 10-12 годин після введення. Введення 1,5 мкг ентеротоксину викликало загибель 50 % піддослідних тварин. Стафілококові ентеротоксини характеризувалися високою активністю і внутрішньом'язове введення 0,8 мкг ентеротоксину викликало втрату маси піддослідних тварин від 150-200 г.

Попередньо проведені нами дослідження показали можливість отримувати анти-ентеротоксинні сироватки з високими титрами Ig до А і В серотипів, які і були використані при проведенні подальших досліджень з метою ідентифікації серотипів ентеротоксинів серед бактеріальних ізолятів (копро- і уринокультур) від хворих дітей з різними патологічними процесами шлунково-кишкового тракту (ШКТ), а також фільтратів харчових продуктів. Виходячи з даних, отриманих в результаті проведення досліджень, ми починали імунізацію з дуже маленьких доз: для ентеротоксинів Д і Е з 0,15 мкг і для ентеротоксину С - 0,3 мкг.

За всіма апробованими схемами імунізацію проводили зростаючими дозами з використанням повного ад'юванта Фрейнда, контролем в цій серії дослідів були відтворені у тій же послідовності схеми введення відповідних доз ентеротоксинів без ад'юванта. Також використовувалися схеми імунізації, в яких останні чотири ін'єкції не містили ад'юванта Фрейнда і в наступних схемах ад'ювант Фрейнда замінили на окис алюмінію. Для цього 100 мкг ентеротоксину змішували з 1 мл фосфату алюмінію (14 мг/мл) і вводили внутрішньом'язово (табл. 1,2,3) . Апробовані різні схеми імунізації дозволили визначити оптимальні дози і шляхи введення антигенів. Як з'ясувалося, найбільш доцільно, незалежно від застосованої схеми, останні чотири дози вводити підшкірно, що створює умови поступового всмоктування антигенів і постійного зростання титру Ig.

Таблиця 1 Схема імунізації кролів очищеними препаратами ентеротоксинів

Тиждень	Кількість ентеротоксину в мкг	Вага кроля до введення (в грамах)	Вага кроля після введення ентеротоксинів (в грамах)	Метод введення	Титри Ig в реакції на мікрослайдах
1	0,15	2800	2400	в/м	"
2	0,15	2850	2700	в/м	-
3	0,3	2800	2700	в/м	-
4	3,0	2820	2750	в/м	-
5	20,0	2850	2700	в/м	-
6	100,0	2850	2800	в/м	-
7	500,0	2900	2750	-	1:20
8	1000	2870	2800	п/ш	1:40
9	1000	2900	2800	п/ш	1:60
10	2000	2850	2780	п/ш	1:80
11	2000	2900	2800	п/ш	1:120

Протягом усього періоду імунізації у кроликів періодично проводили забір крові з метою визначення титру антитоксинів в реакції Удена і гель-дифузії на предметних скельцях-мікрослайдах. Аналіз отриманих результатів дозволив встановити, що використання ад'юванта Фрейнда обумовлювало можливість отримувати сироватки

з високими титрами Ig при циклі імунізації тривалістю 9-11 тижнів.

Слід зазначити - у деяких дослідях ми були змушені вводити попередню дозу ентеротоксину, так як піддослідні тварини втрачали у вазі більше 200г маси тіла.

Таблиця 2 Схема імунізації кролів очищеними препаратами ентеротоксинів з повним ад'ювантом Фрейнда

Тижні	Кількість энтеротоксинів в мкг	Вага кроля(в грамах)		Метод введення	Титри Ig в реакції на мікрослайдах
		До введення	Після введення		
1	0,3	2650	2570	в/м	-
2	3,0	2600	2510	в/м	-
3	30,0	2630	2600	в/м	-
4	1000,0	2650	2480	в/м	-
5	1000,0	2600	2500	в/м	1:30
6	1500,0	2600	2500	в/м	1:60
7	1500,0	2650	2530	п/ш	1:80
8	2000,0	2680	2600	п/ш	1:120
9	2500,0	2750	2620	п/ш	1:280
10	2500,0	2800	2700	П/ш	1:512

Таблиця 3 Схема імунізації кролів очищеними ентеротоксинами адсорбованими на окису алюмінію

Тижні	Доза в мкг	Вага кролів(в грамах)		Титри Ig в реакції на мікрослайдах
		до введення	після введення	
1	0,3	2700	2600	-
2	3,0	2700	2600	-
3	30,0	2750	2620	-
4	1000,0	2780	2600	-
5	1000,0	2800	2720	1:20
6	2000,0	2780	2650	1:30
7	2000,0	2820	2700	1:120
8	2000,0	2850	2750	1:360
9	2500,0	2850	2780	1:480

Введення зростаючої дози антигену в цих випадках було недоцільно - тварини реагували різкою втратою маси тіла - 250-300г і іноді спостерігалися летальні наслідки. За цих умов імунізація могла тривати до 14-15 тижнів.

Введення антигену адсорбованого на окису алюмінію, як з'ясувалося в процесі імунізації, не викликало різкої втрати маси тіла кроля, вимагало дев'ятитижневого циклу імунізації, проте титри антиенеротоксичних сироваток були дещо нижчі, ніж при використанні, як індуктора імунної відповіді, ад'юванта Фрейнда. Отримання антиенеротоксичних сироваток з високими титрами завжди було обумовлено наявністю високоочищених препаратів ентеротоксинів, що створювало певні труднощі, тому ми провели ряд заходів по модифікації схем імунізації з метою полегшення методичних прийомів і збереження витрат високоочищених препаратів ентеротоксинів.

З цієї метою було проведено ряд досліджень з використанням для імунізації неочищених препаратів ентеротоксинів (табл. 5), тобто використовували комбінований метод імунізації. Попередньо, до проведення імунізації, з метою інактивації гемолізину, нативні препарати прогрівали 15-20 хвилин при 55°C. Залишкову

концентрацію ентеротоксинів орієнтовно визначали в реакції простої гел-дифузії по Уден. Перші 8 ін'єкцій вводили зростаючими дозами щотижня, починаючи з 3 мкг, що відповідало 0,5 мл культуральної рідини. Надалі, починаючи з 9 ін'єкції, вводили очищені препарати ентеротоксинів в суміші з повним ад'ювантом Фрейнда, або окису алюмінію. Попередні випробування довели доцільність використання активаторів імунної відповіді при введенні ін'єкцій як нативних, так і очищених антигенних субстанцій (табл. 4).

Препарати ентеротоксинів вводили щотижня до 15 ін'єкцій з ад'ювантом Фрейнда, крім того в одній з схем, в даній серії дослідів, останні чотири ін'єкції вводили без ад'юванта, однак у цьому випадку спостерігали незначне зростання титру Ig. Особливо характерно таке положення було при імунізації лабораторних тварин серотипами D і E, що давало наявність перехресних реакцій з ентеротоксином серотипу A. Використання ад'юванта Фрейнда дозволяло уникнути цього небажаного явища і отримати високоактивні монозональні антиенеротоксичні сироватки до всіх серотипів ентеротоксинів.

Таблиця 4 Схема імунізації кроликів нативними і очищеними препаратами ентеротоксинів

Тижні	Кількість ентеротоксинів в мкг	Вага кролів		Метод введення	Титри Ig в реакції на мікрослайдах
		До введення	після введення		
1	3,0	2900	2800	в/м	-
2	5,0	2850	2720	в/м	-
3	10,0	2870	2750	в/м	-
4	50,0	2850	2750	в/м	-
5	100,0	2870	2720	в/м	-
6	200,0	2890	2750	в/м	-
7	500,0	2900	2820	в/м	1:10
8	500,0	2850	2750	в/м	1:20
9	1000	2850	2720	в/м	1:40
10	1500	2800	2700	п/ш	1:100
11	2000	2850	2700	п/ш	1:160
12	2000	2830	2730	п/ш	1:200
13	2500	2850	2820	п/ш	1:260
14	2500	2900	2800	п/ш	1:320

Таким чином, у процесі імунізації кроликів різними серотипами ентеротоксинів, яка, залежно від використовуваної схеми, тривала 9 або 15 тижнів, вдалося отримати монозональні сироватки до серотипів ентеротоксинів А, В, С, Д і Е. Слід зазначити, що низькі титри Ig 1:5 - 1:10 виявлялися нами після 3-5 тижневого циклу введення антигенного препарату. Подальше зростання титру відбувалося повільніше і титри Ig, придатні для практичної роботи вдавалося отримати в процесі 11-15 тижневої імунізації. Крім того, наявність перехресних реакцій із серії дослідів з референс токсинами дозволила використовувати сироватки з низькими титрами антитіл в якості імунохімічних тестів для визначення загальної характеристики ентеротоксичності культур як *S. aureus* так і *S. epidermidis* без цілеспрямованої ідентифікації серотипу ентеротоксинів. У більшості випадків вищенаведені препарати полівалентних сироваток (А + Д + Е і В + С) використовували при вивченні біологічних ознак і їх корелятивних зв'язків з ентеротоксигенністю. Проведена нами серія дослідів спростила методику визначення ентеротоксигенності досліджуваних штамів і скоротила терміни проведення подібних досліджень. При наявності антиентеротоксичних титрів Ig 1:280 - 1:512 кроликів знекровлювали і для тривалого зберігання частину консервували мертиолятом в концентрації 1:10000.

Специфічність сироватки випробовували з референс-токсинами різних серотипів, які використовували для імунізації. Паралельно в реакції преципітації по Уден в якості контролю досліджували також культуральні центрифугати не ентеротоксигенних культур стафілококів *Wyd-46* і *S. aureus* 209. Для отримання культуральної рідини, вище наведені тест-штами вирощували в целофанових мішечках за методом Касман і Беннет в нашій модифікації, відмивали фосфатним буфером і вносили в лунки

плексигласових пластинок, котрі були нашаровані на 1%-ве середовище РНР, з метою проведення реакції мікропреципітації по Оухтерлані. Контрольні антигени незмінно давали негативні реакції з отриманими типоспецифічними антиентеротоксичними сироватками в титрах 1:10 і вище. В окремих випадках з цими антигенами визначалися позитивні реакції на мікрослайдах в розведенні 1:5, причому при паралельній постановці з референс-ентеротоксинами злиття ліній преципітації не спостерігалось. Крім того, нами зіставленні результати цих досліджень, з даними серії дослідів, проведених з тими ж антигенами, але з типовими сироватками, отриманими нами з лабораторії проф. Бергдолл. Порівняльний аналіз результатів дозволив встановити ідентичність специфічності сироваток. При випробуванні різних схем імунізації кроликів з метою отримання монозональних антиентеротоксичних сироваток ми провели додаткову серію дослідів з використанням суспензії дрібнодисперсної целюлози, на якій фіксували ентеротоксини різних серотипів. Згідно з даними літератури, використання імуносорбентів дає можливість отримання специфічних антитіл, практично вільних від домішок інших білків. Штучний імуносорбент готували фіксацією антигенів стафілококових ентеротоксинів різних серотипів на целюлозній суспензії. Кількість токсину, поглиненого целюлозною матрицею визначали шляхом розрахунку різниці в кількісних характеристиках в розчині до фіксації і після приєднання антигенів до імуносорбенту на спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм. Білки фіксовані на імуносорбенті не вимивалися водними розчинниками.

Для імунізації кроликів були використані дві різні імуносорбентні суспензії целюлози з ковалентно приєднаними білковими ентеротоксичними субодинами і в другому випадку - білково-целюлозний комплекс з

приєднаними до нього антитілами референс-антитоксичних сироваток (табл 5, 6) Ін'єкції вводили в межах проекції лімфатичних вузлів задніх лап. Інтервал між ін'єкціями - 5-7 днів залежно від реакції організму лабораторних тварин. Ревакцинацію проводили через 21 день

після першого циклу імунізації. Слід зазначити, що використання імуносорбенту дозволило скоротити терміни імунізації з 15 тижнів до 8 тижнів, проте титри антиентеротоксичних сироваток не перевищували таких у серії попередніх імунізацій.

Таблиця 5 Схеми імунізації кролів з використанням імуносорбентів

Антиген	Кількість ін'єкцій	Доза ентеротоксину, мкг	Шляхи введення	Ревакцинація, мкг	Титри Ig в реакції на мікрослайдах
Білково-целюлозний комплекс + ентеротоксин	1	5,0	л/у	350-400	1:200
	2	10,0	л/у		
	3	15	л/у		
	4	20	л/у		
	5	50	л/у		
	6	100	п/ш		
	7	200	п/ш		
	8	250	п/ш		

Таблиця 6 Схеми імунізації з використанням імуносорбентів і блокуючих антитіл

Антиген	Кількість-ін'єкцій	Доза ентеротоксину, мкг	Шляхи введення	Ревакцинація, мкг	Титри Ig в реакції на мікрослайдах
Білково-целюлозний комплекс + ентеротоксин блокований антитілами	1	50	л/у	350-400	1:320
	2	100	л/у		
	3	100	л /у		
	4	150	л/у		
	5	250	п/ш		
	6	250	п/ш		

Проведені дослідження з випробування різних схем імунізації дозволили зробити висновок про стимулюючий ефект повного ад'юванта Фрейнда - введення даного інгредієнту в будь-яку схему дозволяло отримати підвищення титрів в 1,5-2 рази. На підставі чого ми зробили спробу стимуляції антитілогенезу ад'ювантом Фрейнда (або окису алюмінію) при імунізації з імуносорбентами (табл.7) .

Таблиця 7 Схеми введення SE з використанням дрібно дисперсної целюлози і повного ад'юванта Фрейнда

Антиген	Кількість ін'єкцій	Доза ентеротоксину, мкг	Шляхи введення	Ревакцинація, доза ентеротоксину	Титр Ig сироватки
Білково-целюлозний комплекс + ентеротоксин ад'ювант Фрейнда	1	10	л/у	Через 25 днів 300 мкг	1:800-В
	2	20	л/у		1:600-С
	3	50	л/у		1:400-А
	4	80	л/у		1:256-Е
	5	120	л/у		1:256-Д

При цьому з'явилася можливість введення значно менших початкових доз ентеротоксинів, скорочення інтервалу між введеннями та отримання високоактивних антиентеротоксичних препаратів. Слід зазначити, що при використанні різних схем імунізації найбільш високі титри Ig стабільно визначалися нами щодо серотипів В і С ентеротоксинів (1:320:1:512), в той час як ентеротоксини Д і Е виявилися слабкими

імуногенами і титри Ig в отриманих сироватках не перевищували 1:200 - 1:256. Отримані титри Ig, однак, давали можливість долати наявність перехресних реакцій з ентеротоксином серотипу А, у той час, як при концентрації антитіл 1:32 - 1:16 спостерігалися поліпреципітаційні перехресні реакції.

З метою отримання чистих антитіл, особливо це стосувалося Д і В сироваток, ми провели серію

послідовних дослідів насичення імуносорбентів різними серотипами з подальшим приєднанням відповідних антитіл. Для насичення імуносорбенту (0,5г імуносорбенту) використовували 10 мл імунної сироватки, інкубували протягом 10 хвилин і центрифугували при 3000 об/хв з експозицією 10 хвилин. Витяг антитіл з центрифугату здійснювали фосфорно - лимонним буфером рН - 3,8. Після промивання імуносорбент використовували в серії повторних дослідів, отримані сироватки перевіряли в перехресних реакціях по Уден і на мікрослайдах і ліофілізували .

**Висновки.** Проведені дослідження показали можливість отримання чистих монозональних антитіл при використанні схем імунізації з повним ад'ювантом Фрейнда, а подальше фракціонування на імуносорбентах дозволило подолати перехресні реакції А, В, С ентеротоксинів, що дало можливість більш вибірково і детально здійснювати ідентифікацію серотипової приналежності як *S. aureus* так і *S. epidermidis*. Крім того наявність чистих високоактивних монозональних сироваток дозволило, при проведенні подальших досліджень, визначити етіологічну значимість серотипів ентеротоксинів при різних патологічних станах стафілококової етіології.

1. Волович Н.И.; Ладаний М.М.; Акатов А.К., Залукаева В.И. О распространенности энтеротоксигенных стафилококков// ЖМЭИ.- 1974.- № 12.- с. 44-49.
2. Волович Н.И., Ладаний М.М., Залукаева В.И. Изучение некоторых условий получения стафилококковых энтеротоксинов/Вопросы биохимии и физиологии микроорганизмов. Межвузовский научный сборник. Выпуск 3. Саратов 1975. с 89- 96.
3. Петросова В.І Вивчення серотипової приналежності ентеротоксинів, продукованих стафілококами різного походження./ Матеріали міжнародного регіонального семінару , Ужгород, 1997,- с.58-61
4. Петросова В.І Виявлення стафілококових ентеротоксинів за допомогою реакції гальмування непрямої гемаглютинації// Науковий вісник УжДУ.-Серія.- Медицина. - 1999.- №9- с.40- 41.
5. Петросова В.І Ідентифікація *Staphylococcus aureus*, ізольованих при харчових отруєннях за спектрами позаклітинних білків/ Матеріали мінародної конференції з питань сімейної медицини.- Науковий вісник УжНУ.- Серія Медицина.-2001.-Вип.16. –с.62-65
6. Петросова В.І, Кравцова М.В. Стафилококциногенная активность энтеротоксигенных стафилококков/ Сборник тезисов БИОЛОГИЯ- НАУКА ХХІ ВЕКА: -14-я Пушкинская международная конференция школа-молодых ученых 19-23 апреля, Пушино.-2010.-с.252
7. Петросова В.І.Петросов О.К.Очистка, отримання, ідентифікація стафілококового ентеротоксину серотипу Д.// Науковий вісник УжНУ.- серія Біологія-2010.-Випуск 28.- с. 35-37
8. Aiping Liu, Yongxia Zhang, Weifeng Chen, Xiaohong Wang, Fusheng Chen Gold nanoparticle-based colorimetric detection of staphylococcal enterotoxin B using ssDNA aptamers European Food Research and Technology September 2013, Volume 237, Issue 3, pp 323-329
9. Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR (2010) Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins* 2:1751–1773 » CrossRef
10. Balaban N, Rasooly A (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61:1–10 » Cross
- Bergdoll MS (1983) In: Easmon CSF, Adlam C (eds) *Enterotoxins*. Academic Press, New York
11. Ewald S, Christensen S (1987) Detection of enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* from aviation catering meals by the ELISA and the microslide immunodiffusion test. *Int J Food Microbiol* 5:87–91 » CrossRef
12. Gisch K, Gehrke N, Bros M, Priesmeyer C, Knop J, Reske-Kunz AB, Suduwe S (2007) Formalin-fixed *Staphylococcus aureus* particles prevent allergic sensitization in a murine model of type I allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 144:183–196 » CrossRef
13. Nedelkov D, Nelson RW (2003) Detection of staphylococcal enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 69:5212–5215 » CrossRef
14. Sandel MK, McKillip JL (2004) Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control* 15:5–10 » CrossRef
15. Hu SK, Liu SY, Hu WF, Zheng TL, Xu JG (2013) Molecular biological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from food. *Eur Food Res Tech* 236:285–291 » CrossRef
16. Ye Y, Zhou YX, Mo ZZ, Cheng W, Yang S, Wang XH, Chen FS (2010) Rapid detection of aflatoxin B1 on membrane by dot-immunogold filtration assay. *Talanta* 81:792–798 » CrossRef

Отримано: 11 березня 2013 р.

Прийнято до друку: 12 травня 2013 р.