

УДК 619:579.842.11:616

ОТРИМАННЯ АНТИТОКСИЧНИХ АНТИТІЛ ДО КОН'ЮГОВАНИХ ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI*

Сухарев Ю. С.¹, Гужвинська С. О.²

Отримання антитоксичних антитіл до кон'югованих ентеротоксинів *Escherichia coli*. — Ю. С. Сухарев¹, С. О. Гужвинська². — Методом афінної адсорбційної хроматографії, використовуючи імуносорбент на основі гаптена з гіперімунних антитоксичних сироваток крові кролів і молозива 1-го надою корів, вакцинованих кон'югатом ентеротоксинів *Escherichia coli*, виділені антитоксини. Отримані антитіла мали високу специфічність, що дає підставу використовувати їх при конструюванні тест-систем для ідентифікації ентеротоксигенних *E. coli*, при діагностиці колібактеріозу сільськогосподарських тварин.

Ключові слова: *Escherichia coli*, антитоксини, імуносорбент, ентеротоксини, гіперімунні антитоксичні сироватки, кон'югат.

Адреса: ¹ – Харківська державна зооветеринарна академія, Мала Даніловка, Дергачівський р-н., Харківська обл., 62341, Україна, e-mail: Yuriy_sukharev@mail.ru; ² – ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААНУ, вул. Пушкінська, 83, м. Харків, Україна.

Getting antitoxic antibodies to enterotoxin's conjugated *Escherichia coli*. — Y. Sukharev¹, S. Guzhvinskaya². — By the method of affine adsorption chromatography, using an immunoabsorbent on the basis of hapten from the hyperimmune antitoxic wheys of blood of crawls and colostrum of 1-th yield of cows, vaccinated conjugate enterotoxins of *Escherichia coli*, selected antitoxins. The got antibodies had high specificity which grounds to use them for constructing of test-sistem for authentication of enterotoxigenic of *E. coli*, at diagnostics of colibacteriosis of agricultural zoons.

Keywords: *Escherichia coli*, antitoxins, immunosorbent, enterotoxins, hyperimmune antitoxic serum conjugate.

Address: ¹ – Kharkov State Zooveterinary Academy, Malaya Danilovka, Dergachevsky district, Kharkov region, 62341, Ukraine; e-mail: Yuriy_sukharev@mail.ru; ² – NNTS Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine NAAS, Pushkinska st., 83, Kharkov, Ukraine.

Вступ

За даними світової літератури, одним з головних критеріїв оцінки патогенності збудника колібактеріозу за сільськогосподарських тварин, є наявність у нього генів, детермінуючих синтез ентеротоксинів: термо-стабільного (ST) і термолабільного (LT), [1, 2].

Гіперімунні сироватки, що застосовуються при колібактеріозі, не містять в повному обсязі комплекс специфічних антитоксичних антитіл, які забезпечують якісний захист тварин від зараження токсигенними штамми кишкової палички, а також роблять неможливим їх використання при проведенні діагностичних досліджень [3, 4]. Завдання ускладнюється тим, що з двох видів ентеротоксинів тільки LT володіє імуногенними властивостями, тоді як ST- гаптен, що робить неможливим одержання імунізуючого препарату на його основі

У зв'язку з тим, що в даний час в Україні не виробляються протиколібактеріозні діагностичні сироватки, які дозволяють ідентифікувати збудника захворювання за його основними факторами патогенності [5, 6], для їх отримання пропонується використовувати кон'югат ентеротоксинів *Escherichia coli*, індукуючий синтез поліклональних біспецифічних антитоксичних антитіл у вакцинованих тварин [7].

Більшість антисироваток, призначених для вивчення певних антигенів, вимагають попереднього

видалення антитіл з небажаною специфічністю. Це неминує при використанні навіть самого чистого імуногена, якщо у нього є спільні епітопи зі спорідненими молекулами, що знаходяться в досліджуваному зразку. Крім того, зазвичай сироватка містить антитіла до контамінуючих молекул, що знаходяться в ін'єктуемій суміші, які можуть бути присутніми в досліджуваних зразках.

Метою досліджень було одержання специфічних антитоксичних антитіл до кон'югованих ентеротоксинів *E. coli*.

Новизна запропонованого рішення полягала в тому, що виділення специфічних антитіл проводили методом афінної адсорбційної хроматографії, за допомогою сконструйованого імуносорбенту на основі гаптена, з гіперімунних антитоксичних сироваток крові і молозива 1-го надою корів, вакцинованих кон'югатом ентеротоксинів *E. coli*.

Матеріали та методи досліджень

Гіперімунні антитоксичні сироватки крові і молозива 1-го надою корів, вакцинованих кон'югатом ентеротоксинів *E. coli*; ліофілізовані LT і ST- ентеротоксини *E. coli*; 0,2 М фосфатний буфер, рН 7,0; 0,1 М гліцин-НСІ буфер, рН 3,2; 1% розчин БСА; 2,5% водний розчин глутаральдегіду; дистильована вода; еритроцити ВРХ; розчин Олсвера; фізіологічний розчин, рН 7,2; 0,5% гліцеринізова-

ний фізрозчин, рН 7,2; 2,5% формальдегід; 0,005% розчин таніну; 0,1% азид натрію; гомогенізатор Поттера; магнітна мішалка; центрифуга; холодильник; термометр; плексігласова панель Такачі; ЗРПГА.

При формалізації еритроцитів готували їх 10% розчин, до нього додавали рівний об'єм фізрозчину з рН 7,2, який містив 5% формальдегіду. Формалізацію проводили протягом 24 годин в термостаті при 37°C при періодичному струшуванні. Еритроцити осаджували центрифугуванням при 2000 г протягом 10 хвилин.

Суміш формалізованих еритроцитів і таніну (1:20000), витримували при 37°C протягом 20 хвилин, при періодичному струшуванні. Танізовані еритроцити осаджували центрифугуванням при 2000 г, дворазово відмивали 0,15 М фосфатним буфером з рН 7,2 і суспензували до 10% концентрації.

Формалізовані і танізовані еритроцити ВРХ осаджували центрифугуванням при 2000 г протягом 10 хвилин і ресуспензували в розчині ST-ентеротоксина *E. coli*, у співвідношенні 1:1. Сенсibiliзовані еритроцити осаджували центрифугуванням при 2000 г протягом 10 хвилин і тричі відмивали двома об'ємами гліцеринізованого 0,5% фізрозчину з рН 7,0.

Результати досліджень

Приготування імуносорбента на основі гаптена: 250 мг ST розчиняли в 5 мл фосфатного буфера, рН 7,0. Додавали по краплях 1–2 мл 2,5% водного розчину глутаральдегіду при перемішуванні, до початку утворення гелю. Витримували гель при кімнатній температурі 3 години, а потім руйнували його в гомогенізаторі Поттера, або продавлюючи через ін'єкційні голки різного діаметру, до утворення дрібних частинок. Промивали гель великою кількістю води, а потім 0,2 М фосфатним буфером, рН 7,4; 0,1 М гліцин-НСІ буфером, рН 3,2 і дали кілька разів фосфатним буфером, рН 7,4. Блокували залишені ділянки зв'язування додаванням 1% (вага/об'єм) розчину БСА у фосфатному буфері в обсязі, рівному обсягу гелю; реакцію проводили протягом 2 годин при кімнатній температурі або протягом ночі при 4°C.

Адсорбція антитоксичних антитіл включала два етапи:

1. Інкубація імуносорбента з гіперімунною сироваткою для формування комплексу антиген-антитіло.
2. Руйнування комплексу імуносорбент-антитіло і елюція антитіл.

Імуносорбент, на основі ST-ентеротоксина, додавали до антитоксичної гіперімунної сироватки крові кролика і молозива корів, у співвідношенні: 10 мг вихідного антигену в сорбенті на 1 мл антисироватки. Суміш ретельно розтирали і перемішували на магнітній мішалці при кімнатній температурі протягом 1–2 годин, потім переносили в холодильник і залишали на 12–15 годин при 4°C.

Через зазначений час антисироватки відокремлювали центрифугуванням при 5000 г протягом 15 хвилин і контролювали повноту її виснаження в ЗРПГА за допомогою еритроцитів ВРХ сенсibiliзованих ST-ентеротоксином *E. coli*.

ЗРПГА проводили мікрометодом за допомогою набору Такачі. У лунки мікропанелі вносили по 25 мкл виснаженої імуносорбентом антитоксичної сироватки до кон'югату ентеротоксинів *E. coli*. Потім додавали по 25 мкл сенсibiliзованих еритроцитів, в робочому розведенні 0,8%. Мікропанель струшували і залишали при кімнатній температурі на 1,5–2,0 години. Облік результатів проводили за видом осаду на дні лунки мікропанелі: позитивна реакція характеризувалася появою осаду еритроцитів у вигляді «парасольки» на дні лунки з рівними або зубчастими краями; негативна реакція – осадженням сенсibiliзованих еритроцитів на дно лунки у вигляді маленького гудзика або кільця. При неповному виснаженні антисироватки, процедуру адсорбції повторювали.

Після видалення виснажених антисироваток імуносорбент суспензували не менше 4 разів в 10-кратному обсязі фізіологічного розчину (рН 7,2), з проміжним центрифугуванням при 2000 г протягом 15 хвилин, для відмивання від незв'язаних антитіл.

Елюцію антитіл проводили гліцин-НСІ буфером (рН 2,5), послідовно 3–4 рази, енергійно перемішуючи осад з 2,5 мл буфера при кімнатній температурі протягом 5–10 хвилин. Елюат відокремлювали центрифугуванням при 5000 г протягом 10 хвилин і відразу нейтралізували до рН 7,0 сухим гідрокарбонатом натрію.

Після елюції імуносорбент відмивали 3–4 рази в 10-кратному обсязі фізіологічного розчину (рН 7,2), з проміжним центрифугуванням при 2000 г протягом 15 хвилин і консервували азидом натрію (1:10000), зберігали при температурі 4°C. Імуносорбент використовували від 3 до 5 разів. Вихід специфічних антитіл, елюйованих з імуносорбента, досягав 60–90%.

Адсорбція специфічних антитіл з гіперімунних антитоксичних сироваток крові кролів і молозива 1-го надою корів, імунізованих кон'югатом ентеротоксинів *E. coli*, приводила до різкого зниження титру антитіл у сироватках. Збільшення кількості циклів використання імуносорбента до 4–5 разів, повністю виснажувало сироватки від антитоксичних антитіл, (табл. 1).

Визначення специфічності антитіл проводили у РДП. Для цього готували серію розведень ST- і LT-ентеротоксинів гомологічних і гетерологічних штамів *E. coli*, від 1:2 до 1:64. Ставили РДП в чашках Петрі або на предметному склі в 0,85% агарі («Difco»). У центральну лунку Пастерівською піпеткою вносили антитіла до кон'югату, виділені за допомогою імуносорбента, а в периферійні – 2-х кратні розведення ST-і LT-ентеротоксинів. У контролі використовували культуральний безклітинний фільтрат *Proteus vulgaris* і стерильне середовище культивування токсигенних штамів *E. coli*. Реакцію проводили при кімнатній температурі у вологій камері протягом 48 годин. При позитивному результаті реакції, навколо лунок з гомологічними антигенами, з'являлися зони преципітації у формі концентричних кілець. Специфічними вважали антитоксини, що давали негативні результати з контрольними антигенами, (табл. 2 і 3).

Таблиця 1. Титр антитіл (РДП) у виснажених, за допомогою імуносорбента, гіперімунних антитоксичних сироватках крові кролів і молозива корів, імунізованих кон'югатом ентеротоксинів *E. coli*

Table 1. Title of antibodies (RDP) in exhausted, by means of immunoadsorbent, hyperimmune antitoxic serums of blood of crawls and colostrum of cows, immunized conjugate on enterotoxins of *E. coli*

Досліджувана сироватка	Вихідний титр антитіл в сироватці ($X \pm s \log_2$), n=4	Кратність використання сорбенту	Титр антитіл у виснаженій сироватці ($X \pm s \log_2$), n=4	P ≤
Антитоксична крові кролів	4,00 ± 1,82	1	2,6 ± 0,18	0,1
		2	1,3 ± 0,21	0,1
		3	0,1 ± 0,03	0,1
		4	–	–
Молозива 1-го надою імунізованих корів	6,66 ± 0,69	1	5,1 ± 1,26	0,1
		2	3,8 ± 0,71	0,1
		3	2,3 ± 0,09	0,1
		4	1,1 ± 0,22	0,1
		5	–	–

Таблиця 2. Титр ентеротоксинів гомологічних і гетерологічних штамів *E. coli*, що визначався у РДП за допомогою антитіл до кон'югату, адсорбованих з антитоксичної гіперімунної сироватки крові кролів

Table 2. Title of enterotoxins of homologous and heterological stamms of *E. coli*, that determined in RDP by means of antibodies to conjugate, adsorbable from the antitoxic hyperimmune serum of blood crawls

Антитіла до кон'югату ентеротоксинів адсорбовані з антитоксичної гіперімунної сироватки крові кролів				
Титр ST-ентеротоксину гомологічного штаму ($X \pm s \log_2$), n=4	Титр ST-ентеротоксину гетерологічного штаму ($X \pm s \log_2$), n=4	Титр LT-ентеротоксину гомологічного штаму ($X \pm s \log_2$), n=4	Титр LT-ентеротоксину гетерологічного штаму ($X \pm s \log_2$), n=4	Контроль безклітинний фільтрат <i>Proteus vulgaris</i>
3,76 ± 0,30	2,65 ± 0,27	4,00 ± 0,35	3,55 ± 0,30	–

Таблиця 3. Титр ентеротоксинів гомологічних і гетерологічних штамів *E. coli*, що визначався у РДП за допомогою антитіл до кон'югату, адсорбованих з антитоксичної гіперімунної сироватки молозива корів 1-го надою

Table 3. Title of enterotoxins of homologous and heterological stamms of *E. coli*, that determined in RDP by means of antibodies to conjugate, adsorbable from the antitoxic hyperimmune serum of colostrum cows of 1-th yield

Антитіла до кон'югату ентеротоксинів адсорбовані з антитоксичної гіперімунної сироватки молозива корів 1-го надою				
Титр ST-ентеротоксину гомологічного штаму ($X \pm s \log_2$), n=4	Титр ST-ентеротоксину гетерологічного штаму ($X \pm s \log_2$), n=4	Титр LT-ентеротоксину гомологічного штаму ($X \pm s \log_2$), n=4	Титр LT-ентеротоксину гетерологічного штаму ($X \pm s \log_2$), n=4	Контроль безклітинний фільтрат <i>Proteus vulgaris</i>
6,26 ± 0,98	4,50 ± 0,81	6,67 ± 0,53	6,00 ± 0,81	–

Висновки

Методом афінної адсорбційної хроматографії, використовуючи імуносорбент на основі гаптену, з гіперімунних антитоксичних сироваток крові кролів і молозива 1-го надою корів, вакцинованих кон'югатом ентеротоксинів *E. coli*, виділені антитоксини. Отримані антитіла володіли специфічністю як до LT, так і до ST-ентеротоксинів.

Висока специфічність антитоксинів, дає підставу використовувати їх при конструюванні тест-систем для ідентифікації ентеротоксигенних *E. coli*, за їх основними факторами патогенності, при діагностиці колібактеріозу. Цей метод досить простий, не вимагає великої затрати часу і забезпечує гарний вихід антитіл.

1. Wingate D., Phillips S.E., Lewis S.J. Guidelines for adults on self-medication for the treatment of acute diarrhea // Aliment. Pharmacol Ther. – 2001. – 15. – P. 773–782.
2. Qadri F. Prevalence of Toxin Types and Colonization Factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated during a 2-Year Period from Diarrheal Patients in Bangladesh / F. Qadri, S. Kumar Das, A.S.G. Faruque, G.J. Fuchs, M. John Albert, R.B. Sack, A.-M. Svennerholm // J. Clin Microbiol. – 2000. January; 38(1). – P. 27–31.
3. Искра И.Ю. Гипериммунные сыворотки, их применение. Краткая история /И.Ю. Искра// Сеть ветеринарных клиник “Алден-Вет”. – 2007.
4. Малов В.А. Антибактериальные препараты в лечении острых кишечных (диарейных) заболеваний /В.А. Малов, А.Н. Горобченко //Лечащий врач. – 2006. – №5. – С. 5–6.
5. Thielman N.M., Acute infectious diarrhea /N.M. Thielman, R.L. Guerrant //N. Engl. J. Med. – 2004. – V. 350 (1). – P. 38–47.
6. Qadri F., Prevalence of Toxin Types and Colonization Factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated during a 2-Year Period from Diarrheal Patients in Bangladesh /F. Qadri, S. Kumar Das, A.S.G. Faruque, G.J. Fuchs, M. John Albert, R.B. Sack, A.-M. Svennerholm // J. Clin Microbiol. – 2000. January; 38(1). – p. 27–31.
7. Сухарев Ю.С. Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе) /Ю.С. Сухарев; Харьков. – Коллегиум. – 2009. – 92с.

Отримано: 11 грудня 2010 р.

Прийнято до друку: 25 січня 2011 р.