

УДК 619:579.842.11

Ю. С. Сухарєв¹, канд. біол. наук,
С. О. Гужвинська², канд. с.-г. наук

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

¹ Харківська державна зооветеринарна академія,

² ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»
НААН України, Харків

Найпоширенішим серед новонароджених сільськогосподарських тварин інфекційних захворювань, спричинюваних *Escherichia coli*, є колібактеріоз, що створює одну з найсерйозніших проблем для сучасної ветеринарної медицини [1–3].

За даними світової літератури, одним із головних критеріїв оцінки патогенності збудника колібактеріозу є наявність у нього генів, детермінуючих синтез ентеротоксинів: термостабільного (ST) і термолабільного (LT), з експресією яких і пов'язаний розвиток діарейного синдрому при цьому захворюванні [4].

Гіперімунні сироватки, що застосовуються при колібактеріозі, на жаль, не містять у 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 [5; 6]. Завдання ускладнюється тим, що

з двох видів ентеротоксинів тільки LT має імуногенні властивості, тоді як ST — гаптен, що робить неможливим одержання імунізуючого препарату на його основі.

Оскільки сьогодні в Україні не виробляють протиколібактеріозні діагностичні сироватки, які дозволяють ідентифікувати збудника захворювання за його основними факторами патогенності [7], для їх отримання пропонують використовувати кон'югат LT/ST-ентеротоксинів *E. coli*, індукуючий синтез антитоксичних антитіл, специфічних як до LT, так і до ST [8].

Більшість антисироваток, призначених для вивчення певних антигенів, потребують попереднього видалення антитіл із небажаною специфічністю. Це неминуче при використанні навіть найчистішого імуногена, якщо у нього є спільні епітопи зі спорідненими молекулами. Крім того, зазвичай сироватка містить антитіла до контамінуючих молекул, що знаходяться в імунізуючому препараті, які

можуть бути присутніми в досліджуваних зразках.

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

Матеріали та методи дослідження

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

Результати дослідження та їх обговорення

Приготування імуносорбента на основі гаптenu: 250 мг ST розчиняли в 5 мл фосфатного буфера, рН 7,0. Додавали по краплях 1–2 мл 2,5%-го водного розчину глутаральдегіду при перемішуванні, до початку утворення гелю. Витри-

мували гель при кімнатній температурі 3 год, а потім руйнували його в гомогенізаторі Поттера або продавлювали через ін'єкційні голки різного діаметра, 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 далі кілька разів фосфатним буфером, рН 7,4. Блокували залишені ділянки зв'язування додаванням 1%-го (вага/об'єм) розчину БСА у фосфатному буфері в об'ємі, рівному об'єму гелю; реакцію проводили протягом 2 год при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °С.

Адсорбція антитоксичних антитіл містила два етапи:

1. Інкубація імуносорбента з гіперімунною сироваткою для формування комплексу антиген-антитіло.

2. Руйнування комплексу імуносорбент-антитіло й елюція антитіл.

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

Після цього антисироватки відокремлювали центрифугуванням при 5000 г протягом 15 хв і контролювали повноту їх виснаження в реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) за допомогою еритроцитів великої рогатої худоби (ВРХ), сенсibiliзованих ST-ентеротоксином *E. coli*.

Після видалення виснажених антисироваток імуносорбент суспендували не менше 4 разів у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (рН 7,2),

із проміжним центрифугуванням при 2000 г протягом 15 хв, для відмивання від незв'язаних антитіл.

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

Після елюції імуносорбент відмивали 3–4 рази в 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (рН 7,2), центрифугували при 2000 г протягом 15 хв і консервували азидом натрію (1:10 000), зберігали при температурі 4 °С. Імуносорбент використовували від 3 до 5 разів. Вихід специфічних антитіл, елюйованих з імуносорбента, сягав 60–90 %.

Адсорбція специфічних антитіл із 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 вико-

ристання імуносорбента до 4–5 разів повністю виснажувало сироватки від антитоксичних антитіл (табл. 1).

Специфічність антитіл визначали у реакції дифузної преципітації (РДП) на предметному склі в 0,85%-му агарі “Difco”. У центральну лунку вносили антитіла до кон'югату, а в периферійні — 2-кратні розведення ST- і LT-ентеротоксинів. У контролі використовували культуральний безклітинний фільтрат токсигенного штаму *Proteus vulgaris* і стерильне середовище культивування токсигенних штамів *E. coli*. Реакцію проводили при кімнатній температурі у вологій камері протягом 48 год. При позитивному результаті реакції навколо лунок із гомологічними антигенами з'являлися зони преципітації у формі концентричних кілець. Специфічними вважали антитоксини, що давали негативні результати з контрольними антигенами (табл. 2 і 3).

Висновки

1. Методом афінної адсорбційної хроматографії, використовуючи імуносорбент на ос-

Таблиця 1

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

Досліджувана сироватка	Вихідний титр антитіл у 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	2,60±0,18	≤0,05
		2	1,30±0,21	≤0,05
		3	0,10±0,03	≤0,05
		4	—	—
Молозива 1-го надою імунізованих корів	6,66±0,69	1	5,10±1,26	≤0,05
		2	3,80±0,71	≤0,05
		3	2,30±0,09	≤0,05
		4	1,10±0,22	≤0,05
		5	—	—

Таблиця 2

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

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

Таблиця 3

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

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

нові гаптену, з гіперімунних антитоксичних сироваток крові кролів і молозива 1-го надою корів, вакцинованих кон'югатом ентеротоксинів *E. coli*, виділені антитоксини.

2. Отримані антитіла мали специфічність як до LT-, так і до ST-ентеротоксинів.

3. Висока специфічність антитоксинів дає підставу використовувати їх при конструю-

ванні тест-систем для ідентифікації ентеротоксигенних *E. coli* за їх основними факторами патогенності, при діагностиці колібактеріозу. Цей метод досить простий, не потребує багато часу і забезпечує ефективний вихід антитіл.

ЛІТЕРАТУРА

1. Олійник Л. В. Фактори патогенності шиготоксинпродукуючих ешерихій, виділених від здорової великої рогатої худоби / Л. В. Олійник, Л. В. Зоценко // Вісник Білоцерківського ДАУ. — Біла Церква, 2004. — № 28. — С. 166–171.
2. Липин А. В. Диспепсія телят / А. В. Липин // Ветеринарний консультант. — 2002. — № 15. — С. 6–7.
3. Ломако Ю. В. Эпизоотический мониторинг колибактериоза новорожденных телят в Республике Беларусь / Ю. В. Ломако, Н. Н. Андросик // Ветеринарная медицина Беларуси. — 2002. — № 2. — С. 15–17.
4. Wingate D. Guidelines for adults on self-medication for the treatment of acute diarrhea / D. Wingate, S. E. Phillips, S. J. Lewis // Aliment. Pharmacol. Ther. — 2001. — Vol. 15. — P. 773–782.
5. Искра И. Ю. Гипериммунные сыворотки, их применение. Краткая история / И. Ю. Искра // Сеть ветеринарных клиник «Алден-Вет». — 2007. — С. 10–15.
6. Малов В. А. Антибактериальные препараты в лечении острых кишечных (диарейных) заболеваний / В. А. Малов, А. Н. Горобченко // Лечащий врач. — 2006. — № 5. — С. 5–6.
7. Thielman N. M. Acute infectious diarrhea / N. M. Thielman, R. L. Guerrant // N. Engl. J. Med. — 2004. — Vol. 350 (1). — P. 38–47.
8. 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. — 92 с.

УДК 619:579.842.11
Ю. С. Сухарев, С. О. Гужвинська
ОТРИМАННЯ АНТИТОКСИЧНИХ АНТИТІЛ ДО КОН'ЮГОВАНИХ ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI*

Методом афінної адсорбційної хроматографії за допомогою імуносорбента на основі гаптену 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, імуносорбенти, ентеротоксини, гіперімунні антитоксичні сироватки.

UDC 619:579.842.11
Yu. S. Sukharev, S. O. Guzhvinska
GETTING ANTITOXIC ANTIBODIES TO ENTEROTOXIN'S CONJUGATED *ESCHERICHIA COLI*

Using immunosorbent-based hapten, by affinity adsorption chromatography of hyperimmune antitoxic rabbit sera and colostrum 1st milking cows vaccinated with the conjugate enterotoxin *Escherichia coli*, antitoxins were isolated. Production of antibodies is highly specific, which gives reason to use them in the design of test systems for identification of enterotoxigenic *E. coli*, while diagnosing colibacteriosis of agricultural animals.

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