

УДК УДК619:579.842.11:616

**СПОСІБ ОТРИМАННЯ ГІПЕРІМУННОЇ СИРОВАТКИ ДО
ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI***

Ю.С. СУХАРЄВ, кандидат біологічних наук

Харківська державна зооветеринарна академія

*Розроблено спосіб отримання гіперімунної антитоксичної сироватки крові до ентеротоксинів *Escherichia coli*, новизна якого полягає у використанні як імуногена кон'югата ентеротоксинів, індукуючого синтез біспецифічних антитоксичних антитіл у вакцинованих тварин. Антитоксична сироватка, з титром антитіл 1:32, визначала в РДП ST-ентеротоксин *E.coli* в концентрації 6,25 мкг/мл, а LT- 3,12 мкг/мл, що дозволяє ідентифікувати збудника колібактеріозу за його основними чинниками патогенності.*

Ключові слова: *Escherichia coli*, антитоксична сироватка, кон'югат, ентеротоксини, біспецифічні антитіла.

Актуальною проблемою для тваринництва у світі є колібактеріоз [4, 6]. Не даремно в багатьох розвинених країнах (США, Канада, Великобританія та ін.) колібактеріоз тварин знаходиться під пильною увагою ветеринарних і медичних лікарів, а також Всесвітньої організації охорони здоров'я [9], оскільки важливу роль в інфекційній патології людини стали грати *Escherichia coli*, що виробляють ентеротоксини [10], резервуаром яких є сільськогосподарські тварини [12].

Недоліком існуючих гіперімунних сироваток, які використовують при колібактеріозі сільськогосподарських тварин є те, що вони не містять в повному обсязі комплекси специфічних антитоксичних антитіл, які забезпечують якісний захист тварин від зараження токсигенними штамми *Escherichia coli*, а також роблять неможливим їх використання при проведенні діагностичних досліджень [2, 3].

Нині в Україні не виробляються протиколібактеріозні діагностичні сироватки, що дозволяють ідентифікувати збудника захворювання за його основними чинниками патогенності, якими є термолабільний (LT) і термостабільний (ST) ентеротоксини [5, 11].

Метою досліджень було отримання гіперімунної сироватки крові, яка б містила в повному обсязі комплекс специфічних антитоксичних антитіл до ентеротоксинів *E.coli*. Але відомо, що з двох видів ентеротоксинів кишкової палички лише LT-ентеротоксин володіє імуногенними властивостями, тоді як ST - є гаптенем [1, 13].

Матеріали і методи досліджень. У роботі використовували токсигенні штами *E.coli* з колекції лабораторії хвороб молодняка Національного наукового центру "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини" НААН України: O26 LT⁺ і O9 ST⁺; 0,1 М фосфатний буфер з рН 6,8; 0,15 М розчин хлориду натрію; карбонат-бікарбонатний буфер; глутаральдегід ("Reanal", Угорщина); хроматографічну колонку 0,9×60 см; сефадекс G-25; ПЕГ з молекулярною масою 3000 D; діалізні мішечки; центрифугу; спектрофотометр; холодильник.

Кон'югат готували так: 100 мг ліофілізованого LT-ентеротоксину розчиняли в 2,0 мл 0,1 М фосфатного буфера з рН 6,8, який містив 12,5 г/л глутаральдегіду. Через 18 год експозиції при кімнатній температурі суміш наносили на хроматографічну колонку 0,9×60 см з сефадексом G-25, врівноважену 0,15 М розчином хлориду натрію. Фракції, що містили активований LT (екстінція при 403 нм) об'єднували і концентрували до 1/10 вихідного розчину поліетиленгліколем (ПЕГ) з молекулярною масою 3000 D. До цього розчину додавали 50 мг ST, розчиненого в суміші 10 мл 0,15 М хлориду натрію і 1,0 мл карбонат-бікарбонатного буфера. Через 24 год інкубації при температурі 4 °С додавали 1,0 мл 0,2 М розчину лізину і на 2 год ставили на діаліз проти 0,1 М фосфатного буфера. Кон'югат центрифугували 20 хв при 2000 g і зберігали при температурі 4 °С. Кількість ST в кон'югаті визначали за вмістом білка в діалізаті.

Сироватки отримували шляхом гіперімунізації кроликів породи шиншила масою 2,0-2,5 кг кон'югатом ентеротоксинів, за розробленою схемою [8]. Для цього кон'югат ентеротоксинів змішували з рівними об'ємами повного ад'юванта Фрейнда або 30%-вого розчину гідроокису алюмінію. При імунізації кроликів використовували 200 мкг кон'югата в об'ємі 0,5 мл. Імунізацію проводили двічі з інтервалом 21 день. Антиген вводили внутрішньом'язово в дві-чотири точки. Пробне кровопускання здійснювали на 7-8-й день після ревакцинації і визначали специфічну активність сироватки в реакції дифузійної преципітації (РДП), з ST- і LT-ентеротоксинами гомологічних штамів *E.coli*. За наявності в отриманій сироватці титрів антитіл не нижче 1:8-1:16 проводили тотальний забір крові.

Активність і специфічність сироваток визначали за титром антитоксинів у РДП, з гомологічними і гетерологічними антигенами. Для цього готували серію розведень антитоксичної сироватки від 1:2 до 1:64 і ставили РДП в чашках Петрі або на предметному склі в 0,85%-вому агарі ("Difco"). У центральну лунку Пастерівською піпеткою вносили антигени (ST- або LT-ентеротоксини, в концентрації 50 мкг/мл), а в периферійні - розведену сироватку. Реакцію проводили при кімнатній температурі в вологій камері впродовж 48 годин.

Результати досліджень та їх обговорення. Новизна запропонованого рішення полягала в тому, що для отримання антитоксичних сироваток використовували кон'югат ST/LT ентеротоксинів, який індукував утворення антитіл специфічних як до ST, так і до LT-ентеротоксинів *E.coli* [7].

Встановили, що гіперімунна антитоксична сироватка крові кролика до кон'югату ентеротоксинів *E.coli*, у розведенні 1:32, утворювала чіткий преципітат з гомологічними ST- і LT-ентеротоксинами, з концентрацією білка в препаратах 50 мкг/мл (рис.1).

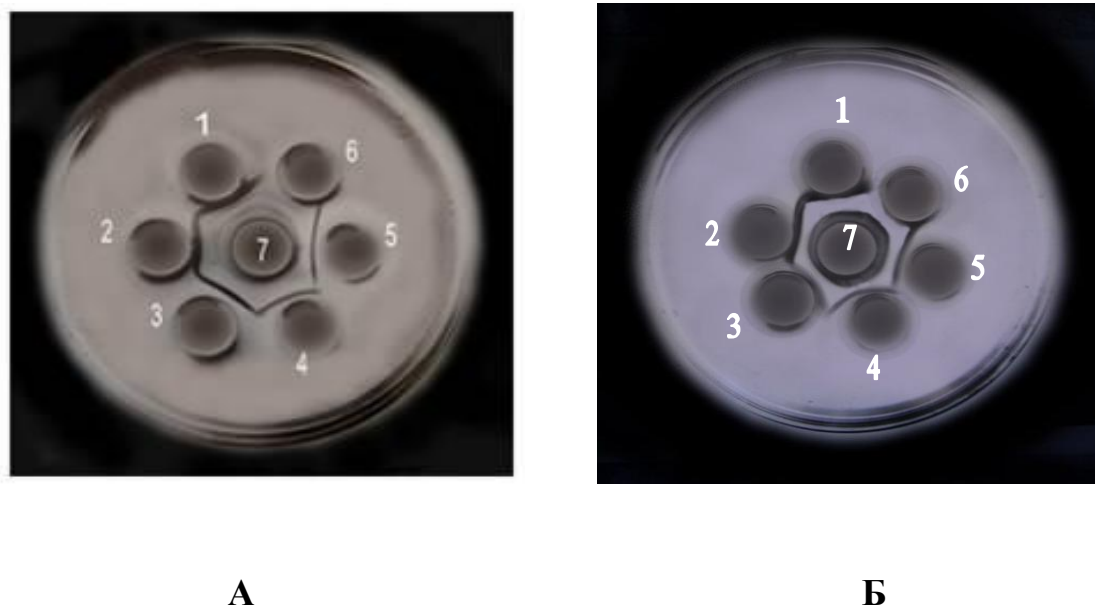


Рис.1. Титр антитіл у гіперімунній антитоксичній сироватці крові кролика, імунізованого кон'югатом ентеротоксинів *E.coli* (РДП): А- до ST - ентеротоксину; Б- до LT -ентеротоксину: 1- сироватка в розведенні 1:2; 2- розведення 1:4; 3- розведення 1:8; 4- розведення 1:16; 5- розведення 1:32; 6- розведення 1:64; 7- гомологічний антиген (50 мкг/мл).

Для визначення здатності антитоксичної сироватки крові виявляти різні концентрації ST- і LT-ентеротоксинів *E.coli*, готували серію розведень токсинів від 100,0 до 1,56 мкг/мл і ставили РДП в 0,85%-вому агарі на тріс-буфері при температурі 37 °С. У центральну лунку вносили гіперімунну сироватку до кон'югату, з титром антитіл 1:32, а в периферійні - різні концентрації досліджуваних ентеротоксинів гомологічних штамів *E.coli*, (рис. 2).

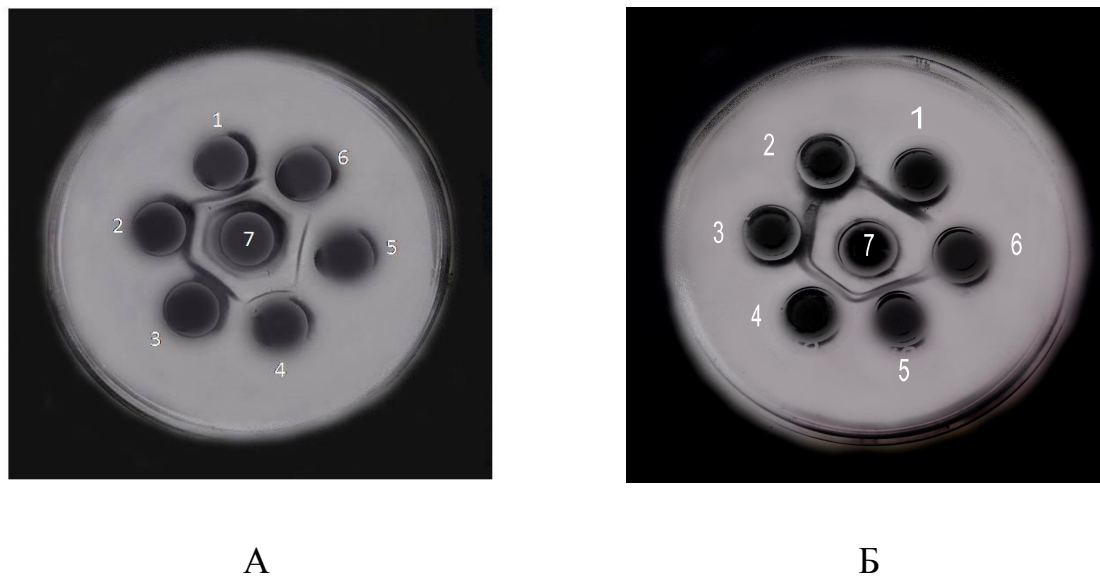


Рис.2. Титр ентеротоксинів *E.coli*, визначений за допомогою гіперімунної антитоксичної сироватки крові кролика, імунізованого кон'югатом ентеротоксинів (РДП): А- ST-ентеротоксин; Б- LT-ентеротоксин. 1- 100 мкг/мл; 2- 50 мкг/мл; 3- 25 мкг/мл; 4- 12,5 мкг/мл; 5- 6,25 мкг/мл; 6- 3,12 мкг/мл; 7- гіперімунна антитоксична сироватка до кон'югату ентеротоксинів.

Висновки

1. Імунізуючий препарат на основі кон'югованих токсинів індукує синтез біспецифічних антитіл з титром 1:32 як до ST-, так і LT-ентеротоксинів *E.coli*.
2. Гіперімунна антитоксична сироватка крові кролика ідентифікувала ST- і LT-ентеротоксини в концентраціях відповідно 6,25 мкг/мл і 3,12 мкг/мл, що свідчило про високі імуногенні властивості кон'югату.
3. Одержана сироватка може використовуватися як лікувально-профілактичний засіб при колібактеріозі сільськогосподарських тварин, так і для ідентифікації ентеротоксигенних *E.coli* за їх основними чинниками патогенності, при діагностиці цього захворювання.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексанкин А.П. Иммуноферментная тест-система для определения термолабильного энтеротоксина эшерихий / [А.П.Алексанкин, К.Ш.Матевосян, О.С.Белоновская, С.Н. Серебряков] // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии: Сб. научн. тр. – М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. - 2004 – 2005. - С. 53 - 56.
2. Иванов А.С. Современные подходы к микробиологической диагностике и терапии инфекционных диарей /А.С.Иванов //Болезни органов пищеварения. - 2004. - №2 - С.20 - 25.
3. Искра И.Ю. Гипериммунные сыворотки, их применение /И.Ю. Искра //Сеть ветеринарных клиник “Алден-Вет”. - 2007. - С.10 - 15.
4. Малов В. А., Горобченко А. Н. Острые инфекционные диарейные заболевания / В. А. Малов, А. Н. Горобченко // Лечащий Врач – 2005. – №2. – С. 6 – 8.
5. Олійник Л.В., Зоценко Л.В. Фактори патогенності токсинпродукуючих ешерихій, виділених від здорової великої рогатої худоби / Л.В.Олійник, Л.В. Зоценко //Вісник Білоцерківського ДАУ. - 2004. - №28. - С. 166 - 171.
6. Олійник Л.В. Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу / Олійник Л.В. // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. Харків/ - 2004. - №83. – С.167 - 170.
7. Пат. А61К 39/108 Україна. Спосіб виготовлення гіперімунної антитоксичної сироватки до кон'югату термостабільного і термолабільного ентеротоксинів *E.coli* /Сухарєв Ю.С.–№30128; заявлено 06.11.2007; опубл.11.02.2008.- бюл. №3.

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.
9. Kosek M., Bern C., Guerrant R. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000 / Kosek M., Bern C., Guerrant R // Bull.World.Health.Organ. – 2003. - 81(3). – P.197 - 204.
10. Gomi H., Jiang Z.-D., Adachi J. A., Ashley D., Lowe B., Verenkar M. P., Steffen R., DuPont H. L. In vitro antimicrobial susceptibility testing of bacterial enteropathogens causing traveler's diarrhea in four geographic regions / H.Gomi, Z.-D.Jiang, J. A.Adachi, D.Ashley, B.Lowe, M. P.Verenkar, R.Steffen, H. L. DuPont // Antimicrob. Agents Chemother. - 2001. – 45. – P. 212 - 216.
11. 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, et al.//J. Clin Microbiol - 2000. - January - 38(1). - P. 27 – 31.
12. Thielman N. M., Acute infectious diarrhea /N. M.Thielman, R. L.Guerrant //N. Engl. J. Med. - 2004. - V.350 (1). - P.38 - 47.
13. Wingate D., Phillips S.E., Lewis S.J. Guidelines for adults on self-medication for the treatment of acute diarrhea / D.Wingate, S.E.Phillips, S.J Lewis //Aliment. Pharmacol Ther.- 2001.- 15 .- P.773 -782.

Способ получения гипериммунной сыворотки к энтеротоксинам *Escherichia coli*.

Ю.С. Сухарев

Разработан способ получения гипериммунной антитоксической сыворотки крови к энтеротоксинам *Escherichia coli*, новизна которого заключалась в использовании в качестве иммунизирующего препарата конъюгата энтеротоксинов, индуцирующего синтез биспецифических

«Наукові доповіді НУБіП» 2011-4 (26) http://www.nbuu.gov.ua/e-journals/Nd/2011_4/11sys.pdf

антитоксических антител у вакцинированных животных. Антитоксическая сыворотка с титром антител 1:32, идентифицировала в РДП ST-энтеротоксин *E.coli* в концентрации 6,25 мкг/мл, а LT- 3,12 мкг/мл.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, антитоксическая сыворотка, конъюгат, энтеротоксины, биспецифические антитела.

A method of receipt of hyperimmune whey is to enterotoxins of *Escherichia coli*.

Yu.S. Sukharev

Method of receipt of hyperimmune antitoxic whey of blood to the enterotoxins of *Escherichia coli*, the novelty of which consisted in the use as immunizing preparation of conjugate of enterotoxins, that induces the synthesis bispecific of antitoxic antibodies for immunization zoons. An antitoxic whey, with the title of antibodies 1:32, identified in RDP the ST-enterotoxin of *E.coli* in the concentration of 6,25 mkg/ml, and LT- 3,12 mkg/ml.

Key words: *Escherichia coli*, antitoxic whey, conjugate, enterotoxins, bispecific antibodies.

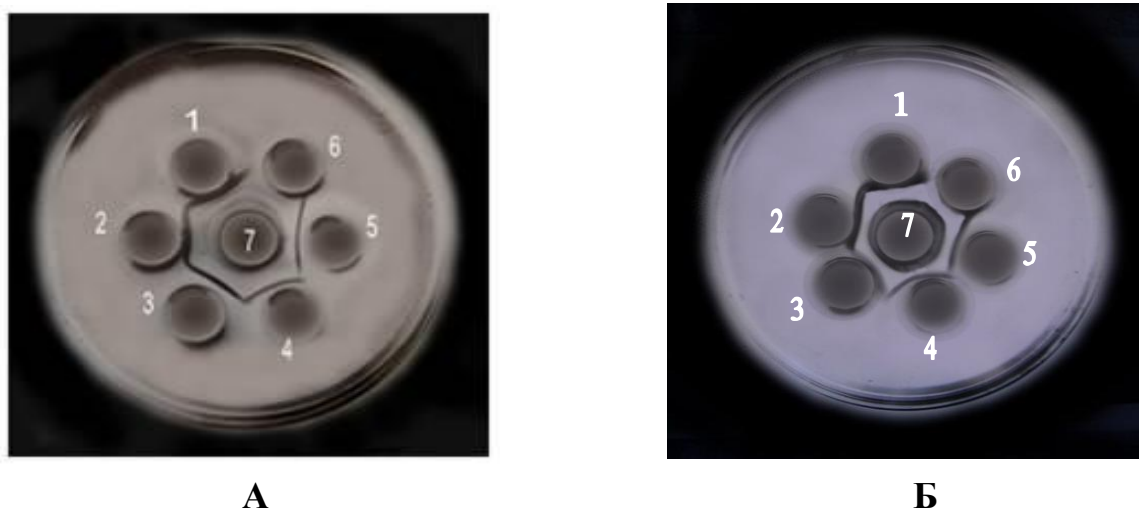


Рис.1. Титр антитіл у гіперімунній антитоксичній сироватці крові кролика, імунізованого кон'югатом ентеротоксинів *E.coli* (РДП): А- до ST - ентеротоксину; Б- до LT -ентеротоксину: 1- сироватка в розведенні 1:2; 2- розведення 1:4; 3- розведення 1:8; 4- розведення 1:16; 5- розведення 1:32; 6- розведення 1:64; 7- гомологічний антиген (50 мкг/мл).

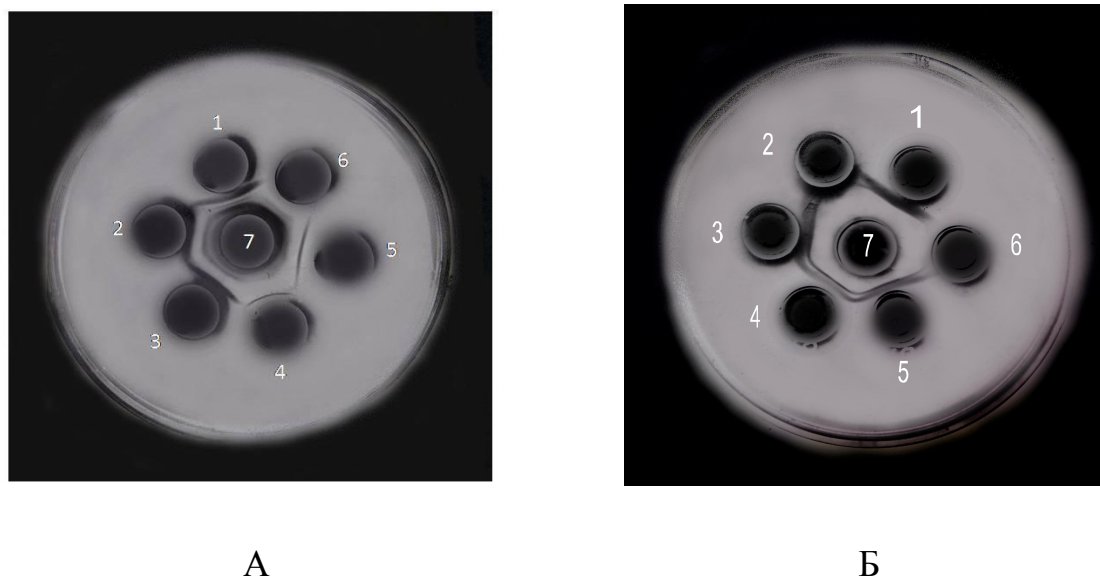


Рис.2. Титр ентеротоксинів *E.coli*, визначений за допомогою гіперімунної антитоксичної сироватки крові кролика, імунізованого кон'югатом ентеротоксинів (РДП): А- ST-ентеротоксин; Б- LT-ентеротоксин. 1- 100 мкг/мл; 2- 50 мкг/мл; 3- 25 мкг/мл; 4- 12,5 мкг/мл; 5- 6,25 мкг/мл; 6- 3,12 мкг/мл; 7- гіперімунна антитоксична сироватка до кон'югату ентеротоксинів.

