

На правах рукописи

Алексанкин Андрей Павлович

**РАЗРАБОТКА ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ LT ПОДОБНЫХ ТОКСИНОВ**

03.00.23 – биотехнология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**



Москва - 2006

Работа выполнена в ГНУ Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева и ГУ Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН

Научные руководители:

кандидат биологических наук
Козловский Юрий Евгеньевич
кандидат биологических наук, доцент
Серебряков Сергей Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Соловьев Борис Васильевич
кандидат биологических наук
Семикрасова Алла Николаевна

Ведущая организация:

ФГОУ ВПО Московская
государственная академия
ветеринарной медицины и
биотехнологии им. К.И. Скрябина

Защита состоится «6» сентября 2006 г. в 15³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.01 при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко по адресу: 109428, Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВИЭВ.

Автореферат разослан « » 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
профессор

Н.П. Овдиенко

Общая характеристика работы

Актуальность темы. В настоящее время во многих районах земного шара острые диарейные заболевания остаются нерешенной проблемой ветеринарии и медицины. Причинами роста распространенности кишечных инфекций является увеличение спектра микроорганизмов, которые вызывают развитие инфекционных процессов и целый ряд факторов, способствующих повышению вирулентных свойств условнопатогенной микрофлоры.

Установлено, что изменения патогенности у бактерий реализуются на генетическом уровне через мутации и генетические рекомбинации (В.М. Бондаренко, 1999).

Если раньше наиболее известными возбудителями острых кишечных инфекций были *Vibrio cholerae*, а также патогены из родов *Shigella* и *Salmonella*, то в настоящее время все большее этиологическое значение приобретают условнопатогенные энтеробактерии в том числе и *Escherichia coli* (А.Р. Мавсютов, С.В. Фиалкина, 2002).

Многочисленными исследованиями было установлено, что ведущую роль в патогенезе диарейных заболеваний играют так называемые цитотонические токсины: термолабильный (LT) и термостабильный (STI, STII) энтеротоксины, синтез которых кодируется плазмидами (Ю.В. Вертиев 1996; B. Spangler 1992; Dallas et al., 1980).

В большинстве случаев от токсикоинфекций страдает молодняк сельскохозяйственных животных, а также пушных зверей. Поскольку токсикоинфекции, обусловленные различными представителями семейства энтеробактерий, наносят серьезный ущерб сельскому хозяйству (Д.Д. Новак, Т.А. Грипина, И.И. Сидорчук и др., 1995), актуальной задачей является борьба с ними.

Серьезная роль в борьбе с токсикоинфекциями отводится их ранней диагностике. Поскольку нет четкой корреляции между принадлежностью энтеробактерий к той или иной серогруппе и типом продуцируемых ими

токсина (О.А. Полякова, 1986), возникает необходимость определения энтеротоксина.

Большинство соответствующих биологических тестов трудоемки, характеризуются низкой чувствительностью, неудовлетворительной воспроизводимостью результатов. В случае энтеротоксинов эшерихий это биопроба на мышцах-сосунках (Dean et al., 1972), тест отека лап у мышей (R.A. Finkelsein, 1976; Вартанян и др., 1978), тест на изолированной петле кишечника кролика (Evans et al., 1973; Holmgren et al., 1982), результат которых зависит от многих факторов и не всегда объективен. Применяемые для определения LT тесты на культурах клеток (C.N. Kwan 1974; S.T. Donta, 1976; Nozawa et al., 1978) так же мало специфичны.

Вышеперечисленных недостатков лишены иммунохимические методы определения энтеротоксинов. Оптимальной, на наш взгляд, является разработка иммуноферментных тест-систем (ИФА) и радиоиммунологических тест-систем (РИА) для определения энтеротоксинов. ИФА, так же как и РИА, намного более специфичен и чувствителен, чем биологические методы или методы, основанные на преципитации, но не требует применения радиоактивных реагентов. Идеальным инструментом для создания подобных методов индикации энтеротоксинов эшерихий являются моноклональные антитела (мкАт).

В настоящее время за рубежом получены мкАт к LT и ST энтеротоксинам эшерихий (M. Thomson et al., 1984). Разработаны также твердофазный метод ИФА для определения ST энтеротоксина на основе мкАт и РИА системы для определения LT и ST энтеротоксинов (Yolken et al., 1977).

Учитывая все вышеизложенное, целью нашего исследования является разработка иммунохимических методов для качественного определения термолabile энтеротоксина в исследуемых образцах.

Оптимальным в данном случае является создание иммуноферментного диагностикума с использованием специфических моноклональных антител.

Цель исследования. Целью настоящего исследования является разработка на основе оригинальных мкАт иммуноферментной тест-системы для качественного определения термолabileного энтеротоксина в исследуемых образцах.

Задачи исследования.

1. Выделить и очистить препаративное количество термолabileного энтеротоксина эшерихий.
2. Получить и очистить мкАт к термолabileному энтеротоксину в препаративных количествах.
3. Изучить возможность создания иммунохроматографической тест-системы (ИХА) на основе мкАт.
4. Разработать на основе мкАт специфическую и высокочувствительную иммуноферментную тест-систему для качественного определения термолabileного энтеротоксина.
5. Провести лабораторные испытания разработанной иммуноферментной тест-системы.

Научная новизна исследования.

Новизна настоящего исследования состоит в следующем:

1. С целью увеличения выхода высокоочищенного термолabileного энтеротоксина эшерихий модифицирована схема его выделения и очистки.
2. Показана принципиальная возможность разработки на основе мкАт иммунохроматографического диагностикума для определения термолabileного энтеротоксина.
3. Впервые разработана с использованием оригинальных мкАт иммуноферментная тест-система для качественного определения термолabileного энтеротоксина.

Практическая значимость. На основе проведенных исследований разработан технологический регламент на иммуноферментную тест-систему для качественного определения термолabileного энтеротоксина (ЛТ-ИФА-

ТЕСТ). Разработанная тест-система может быть использована при исследованиях биологического материала в ветеринарной и медицинской практике на наличие LT-подобных токсинов.

Результаты исследований использованы при написании нормативно-технической документации по изготовлению и применению диагностикума для определения термолabileного энтеротоксина (утвержден Секцией пушного звероводства РАСХН протокол №6 от 20 сентября 2005).

Личный вклад соискателя заключается в модификации метода получения и очистки термолabileного энтеротоксина, подборе пары мкАт для разработки иммуноферментного и иммунохроматографического диагностикума с целью определения термолabileного энтеротоксина, проведение лабораторных испытаний разработанного диагностикума по обнаружению термолabileного энтеротоксина в образцах корма и пробах фекалий, анализе и обобщении результатов исследований.

Апробация материалов диссертации. Материалы диссертации доложены на международной научно-практической конференции "Ветеринарная медицина - 2004", (Феодосия, 2004), научной конференции ГУ НИИ морфологии человека РАМН «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», (Москва, 2006), , на заседании Ученого совета ГНУ НИИПЗК им В.А. Афанасьева (2004, 2005, 2006 гг.). Основные положения, выводы и практические предложения, изложенные в диссертации, обсуждены и одобрены на межлабораторном заседании сотрудников ГНУ НИИПЗК им В.А. Афанасьева (2006 г.)

Основные положения, выносимые на защиту. Полученные экспериментальные данные позволяют вынести на защиту следующие основные положения:

-результаты модифицированной схемы по выделению и очистке термолabileного энтеротоксина эшерихий;

-результаты качественного определения LT-подобных токсинов иммуноферментной тест-системой, разработанной на основе оригинальных мкАт;

-результаты качественного определения термолабильного энтеротоксина с помощью иммунохроматографической тест-системы;

-результаты лабораторных исследований по обнаружению термолабильного энтеротоксина в образцах кормов и пробах фекалий с помощью иммуноферментной тест-системы.

Публикации. Основные материалы диссертации изложены в 6 научных статьях, отражающих основное содержание работы.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах компьютерного текста и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, библиографический список используемой литературы, приложения. Работа содержит 19 таблиц и 18 рисунков. В списке использованной литературы 248 источников, в том числе 176 иностранных.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

В работе использовались лабораторные штаммы E.coli C 600 и его производные, холерный токсин (Sigma, США), В-субъединица холерного токсина (Sigma, США), А-субъединица холерного токсина (CALBIOCHEM, США), а так же коллекция штаммов энтеробактерий, изолированных от пушных зверей, сельскохозяйственных животных, человека и выделенных из объектов окружающей среды.

Для культивирования микроорганизмов и получения биомассы, штаммы выращивали в среде Luria-Bertani (LB) в условиях активной аэрации в термостатируемом шейкере при 37⁰С в течение 18 часов. Лизат микробных клеток получали посредством ультразвуковой обработки биомассы по методике М.В. Степановой (1985), воздействием лизоцимом и тритоном X-

100 по методике Г.В. Холминой (1980), мочевиной по методике Л.И. Давыдовой (1998).

Выделение термолабильного энтеротоксина из лизатов осуществляли посредством фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрацией на Sepharose 6B (Amersham Biosciences, США), с последующей аффинной хроматографией на голубой агарозе. Голубую агарозу получали в лабораторных условиях посредством иммобилизации красителя цибакрона голубого 3FGA на агарозной матрице.

Для оценки чистоты выделенных препаратов термолабильного энтеротоксина использовали метод электрофореза в ПААГе с SDS-Na по U.K. Laemmli (1970). Концентрацию белка определяли методом Лоури или путем измерения оптической плотности раствора при 280 нм.

Биологическую активность препарата термолабильного энтеротоксина определяли по методу Ю.П. Вартанян (1978) в тесте отека лап на самках белых мышей линии BALB/c (массой 18-20 г.). Поликлональные антитела к термолабильному энтеротоксину получали посредством иммунизации кроликов породы советская шиншилла (массой 2-2,5 кг) препаратом энтеротоксина.

Обнаружение энтеротоксина и специфических поликлональных антител в сыворотке проводили по методу Ухтерлони (1950). Антигенную активность полученных препаратов оценивали посредством метода I.I. Mekalanos (1978) и выражали в единицах удельной активности (е.а./мг).

Клеточные работы проводили по методике E. Fazekas (1980). Очистку мкАт, содержащихся в асцитической жидкости, проводили высаливанием с помощью сульфата аммония с последующей ионообменной хроматографией на DEAE Toyopearl 650M (Toyo Soda, Япония).

Получение в препаративных количествах мкАт к термолабильному энтеротоксину проводили путем внутрибрюшинного введения клеток гибридом мышам линии BALB/c (массой 18-20 г.) с последующим получением асцитической жидкости.

Конъюгат мкАт с пероксидазой хрена получали перйодатным методом по Вилсону и Накане (1974). Иммунологическую активность асцитов и очищенных мкАт определяли в непрямом ИФА. Для подбора пары мкАт при разработке тест-системы использовали двухцентровой ИФА.

Определение термолабильного энтеротоксина в исследуемых образцах проводили при помощи иммунохроматографических полосок с адсорбированными мкАт к термолабильному энтеротоксину и конъюгатом мкАт с коллоидным золотом (Sigma, США).

Эпитопную специфичность мкАт устанавливали с помощью иммуноблоттинга. Перенос антигена на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизацию с мкАт осуществляли по общепринятой методике (Blake M.S., 1984). Проявление иммунореплики осуществляли при помощи орто-фенилдиамина.

Для статистической обработки полученных результатов пользовались методами вариационной статистики. Достоверность различий между показателями определяли по t-критерию Стьюдента (Г.Ф. Лакин, 1989).

Результаты собственных исследований

Получение и очистка термолабильного энтеротоксина

Для выделения и очистки термолабильного энтеротоксина использовали модифицированный нами метод Л.И. Давыдовой (1998).

Таблица 1 – Последовательности очистки LT

Стадии очистки токсина	Концентрация белка мг/мл	Общая активность е.а. $\times 10^{-3}$	Удельная активность	Степень очистки	Выход %
Грубый экстракт	540,6	1080	9,9	-	100
Сульфат аммония	135,7	270	10,05	39	66,5
Гель-фильтрация	85,7	171	997,6	157	54,3
Аффинная хроматография	0,72	1,44	1165,0	200	37,5

Очистка термолabileного энтеротоксина проводилась в три стадии, включающие в себя фракционирование сульфатом аммония и последовательную хроматографическую очистку посредством гelfильтрации на Sepharose 6B (рис. 1) и аффинную хроматографию на голубой агарозе 3FGA (табл. 1).

В результате проведенной работы была достигнута 200-кратная степень очистки термолabileного энтеротоксина с выходом продукта 37,5%. Антигенная активность определялась в реакции двойной радиальной иммунодиффузии по Ухтерлони с поликлональной антитоксической сывороткой к термолabileному энтеротоксину. Линии преципитации обнаруживаются в разведение токсина в 2, 4, 8 раз, что говорит о его достаточно высокой антигенной активности (рис. 2).

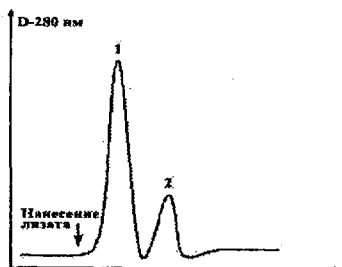


Рис. 1 Гель фильтрация ЛТ на основе Sepharose 6B

1 – пик, содержащий максимальное количество ЛТ,
2 – примесь балластных белков

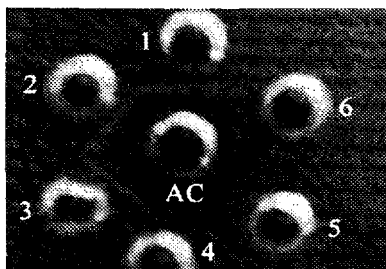


Рис. 2 Результаты реакции иммунодиффузии по Ухтерлони с антитоксической сывороткой

AC – антитоксическая сыворотка,
1, 2, 3, 4, 5, 6 – разведения токсина
в 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 раза.

Чистота препарата была подтверждена денатурирующим электрофорезом в ПААГе с SDS-Na (рис. 3), где наблюдались две полосы, соответствующие по молекулярной массе субъединицам А и В. Титр в реакции Ухтерлони составил 1/8. Биологическая активность очищенного энтеротоксина в тесте отека лап мышей дала положительный результат.

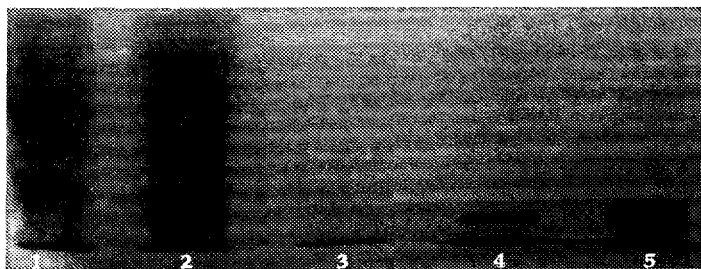


Рис. 3 Электрофореграмма термолабильного энтеротоксина на различных стадиях очистки
 1 - Токсин (сульфатная фракция), 2 - после гель-фильтрации, 3 - после аффинной хроматографии, 4,5 - сконцентрированный в 200 раз токсин.

Очищенный препарат термолабильного энтеротоксина использовался при иммунизации кроликов с целью получения антитоксической сыворотки. Нативную сыворотку очищали посредством ионообменной хроматографии на DEAE Toyopearl 650M (рис. 4) и высаливанием сульфатом аммония. Таким образом, был получен препарат поликлональных антител. Титр очищенной сыворотки в реакции Ухтерлони составил 1/16 (рис. 5). Гомогенность подтверждена электрофорезом в ПААГе с SDS-Na (рис. 6).

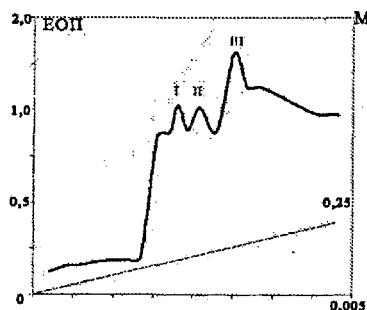


Рис. 4 График элюции поликлональных антител
 ЕОП – единицы оптической плотности элюции при 280 нм. I, II, III – номера фракций. М- молярность. Фракция № III – очищенные поликлональные антитела.

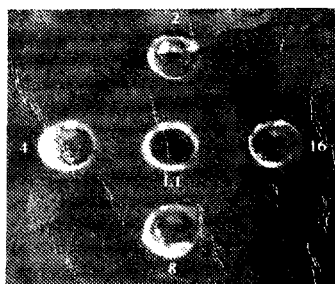


Рис. 5 Реакция Ухтерлони с очищенными поликлональными антителами

1/2, 1/4, 1/8, 1/16 - Титр очищенных поликлональных антител в реакции Ухтерлони

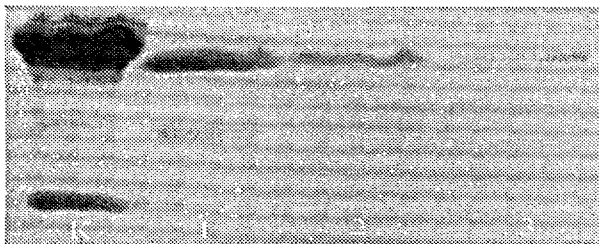


Рис. 6 Электрофореграмма полученных поликлональных антител к термолабильному энтеротоксину

К - контроль (нативная сыворотка).

1, 2, 3 - поликлональные антитела после ионообменной хроматографии, полученные от трех кроликов.

Полученные после очистки поликлональные антитела практически не содержали примесей балластных белков, на электрофореграмме четко видны легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов (рис. 6). Очищенные таким образом поликлональные антитела использовались в дальнейшей работе.

Культуральные работы

Использование перитонеальных макрофагов

За сутки до размораживания исследуемого клона, в 24-луночный планшет со стерильной средой RPMI - 1640 вносили клетки перитонеальных макрофагов (рис. 7). Они служили источником биологически активных веществ и при культивировании поглощали нежизнеспособные клетки.

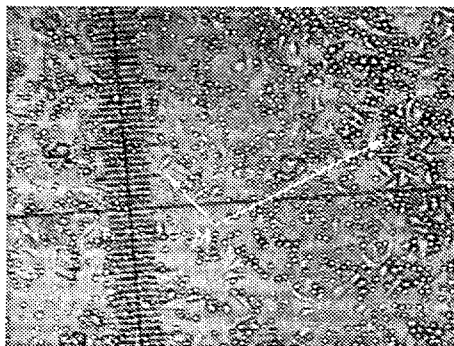


Рис. 7 Перитонеальные макрофаги в культуральной среде
М - перитонеальные макрофаги

Получение препаративных количеств мкАт

Клоны, показавшие положительный результат в непрямом ИФА (табл. 2), были перенесены из 24-х луночных планшетов в культуральные флаконы с целью получения количества клеток, необходимого для внутрибрюшинного введения мышам линии BALB/c. На всех этапах культуральной работы часть клеток обязательно замораживалась в специальной среде с целью предотвращения потери клонов гибридом.

Таблица 2 – Клоны гибридом, используемые в работе

Антиген	Клоны
LT	K ⁸ ₄ , K ¹ ₃ , K ⁹ ₄ , K ¹⁵ ₄ , K ⁴ ₃ , K ¹² ₄

Для всех 6-ти клонов была получена асцитическая жидкость в объеме от 8 до 10 мл (табл. 3). Для первичной очистки мкАт из асцитной жидкости использовали метод осаждения сульфатом аммония с последующей ионнообменной хроматографией на сорбенте DEAE-Toyorearl 650 M (рис. 8).

Таблица 3 - Концентрация иммуноглобулинов в асцитической жидкости

мкАт	Изотип	Содержание мкАт в асцитной жидкости мг/мл
K ¹ ₃	IgG1	10
K ⁹ ₄	IgG1	5,2
K ¹⁵ ₄	IgG1	2,9
K ⁴ ₃	IgG1	13,6
K ¹² ₄	IgG1	1,2

Концентрация иммуноглобулинов в асцитах колебалась от 1,2 до 13,6 мг/мл, наиболее высокими показателями отличались препараты мкАт K¹₃, K⁴₃ и K⁹₄.

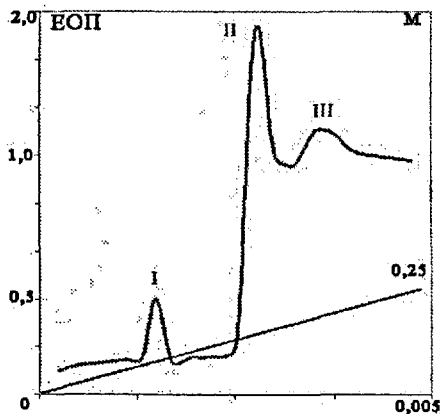


Рис. 8 Элюция антител с колонки для ионнообменной хроматографии

ЕОП – единицы оптической плотности элюции при 280 нм. t – время. I, II, III – номера фракций. М – молярность солевого буфера. Целевой белок содержался во фракции II.

Чистота полученных препаратов моноклональных антител контролировалась методом электрофоретического разделения в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (рис. 9), а активность в прямом ИФА.

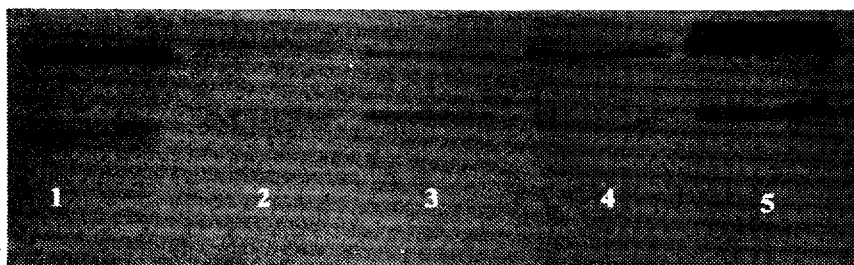


Рис. 9 Электрофорез мкАт в ПААГе в присутствии додецилсульфата натрия

5 – контроль (мкАт до очистки). 1 - K^0 , 2 - K^1 , 3 - K^{15} , 4 - K^3 : различные мкАт после ионнообменной хроматографии. Были очищены мкАт из 4-х различных клонов гибридом, проверенных на активность.

Иммуноблоттинг

Специфичность мкАт проверяли с помощью иммуноблоттинга. В качестве матриксов для связывания термолabileного энтеротоксина при иммуноблоттинге использовали нитроцеллюлозную мембрану (BIO-RAD, США). Перенос субъединиц энтеротоксинов, в том числе термолabileного после денатурирующего электрофореза, проводили в буфере для переноса в течение 1 часа при мощности 70 В и силе тока 250 мА. После завершения переноса осуществляли блокирование неспецифической сорбции в блокирующем буферном растворе на шейкере в течение 30 минут при 37°C. После блокирования проводили гибридизацию с первичными мкАт на шейкере в течение 30 минут при 37 °C. На следующем этапе, проводили отмывку мембраны в промывочном буфере на шейкере 30 минут при 37 °C и добавляли вторичные мкАт, конъюгированные с пероксидазой хрена, полученные против иммуноглобулинов мышей, инкубировали на шейкере 30 минут при 37°C. После инкубации проводили отмывку геля промывочным буфером на шейкере 30 минут при 37°C. Проявление иммунореплики (рис. 10) осуществляли при помощи О-фенилендиамина на шейкере в течение 10 минут при 37°C.

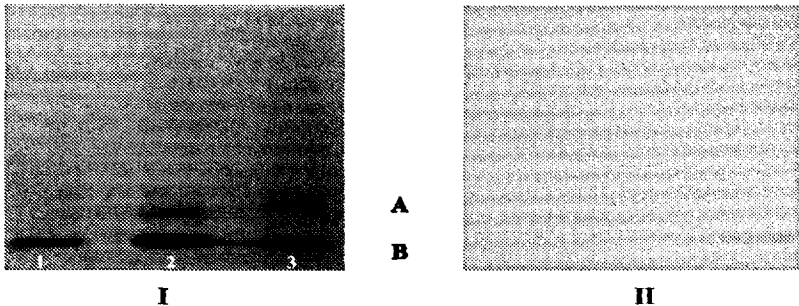


Рис. 10 Иммуноблоттинг с мкАт К⁹

1- В-субъединица холерного токсина (Sigma США); 2 - холерный токсин (Sigma США); 3 - термолabileный энтеротоксин. А - А-субъединица, В - В-субъединица. I – электрофореграмма, II - иммуноблоттинг с мкАт К⁹.

Моноклональные антитела, исследованные таким образом, показали свою специфичность по отношению к рецепторной части молекулы LT и иммунологически родственному ему холерному токсину.

Для разработки тест-системы по определению термолабильного энтеротоксина иммуноферментным методом нами были получены конъюгаты мкАт с ферментом, в данном случае с пероксидазой хрена. Для этого нами была проведена конъюгация 4 мкАт по методу Вилсона и Наканы. Все конъюгаты были активны и применялись в дальнейшей работе как "верхние" антитела.

Подбор специфической пары моноклональных антител для разработки двухцентровой иммуноферментной тест-системы

Следующим этапом наших исследований было проведение экспериментов по одновременному связыванию двух мкАт с термолабильным энтеротоксином методом двухцентрового ИФА (табл. 4)

Таблица 4 - Результаты определения одновременного взаимного связывания двух мкАт с молекулой LT методом двухцентрового ИФА

мкАт конъюгированные с ПХ	Твердофазные мкАт			
	K^1_3	K^9_4	K^{15}_4	K^4_3
K^1_3	—	++	+	++
K^9_4	++	—	++	+
K^{15}_4	+	+	—	++
K^4_3	++	++	+	—

+ положительная реакция, — отрицательная реакция,
++ результат, показавший максимальную оптическую плотность в ИФА.

Таким образом, мкАт K^1_3 образует специфическую пару с мкАт K^9_4 мкАт K^4_3 ; мкАт K^9_4 образуют специфическую пару с K^1_3 K^{15}_4 ; мкАт K^{15}_4 только с мкАт K^4_3 ; мкАт K^4_3 с мкАт K^1_3 с K^9_4 . Данная пара K^4_3 K^9_4 в дальнейшем использовалась при создании диагностикума так как показывала, по сравнению с другими парами мкАт, наибольшую оптическую плотность при минимальной концентрации антигена.

Создание тест-системы для определения LT

При разработке иммуноферментной тест-системы мкАт K^3_3 использовались нами для иммобилизации иммунологических планшетов, а мкАт K^9_4 – в качестве конъюгата (табл. 5, рис. 11). Использование данной пары мкАт в обратном порядке приводит в потере чувствительности разрабатываемой тест-системы. Эта система позволяет определить как В-субъединицу в составе цельной молекулы энтеротоксина, так и ее свободную В-субъединицу.

Таблица 5 - Результаты определения термолабильного энтеротоксина ИФА с использованием пары мкАт K^3_4 и K^9_4

Концентрация LT нг	2000	1000	500	250	125	60	30	0
ЕОП (450 нм)	>2	>2	1,916 $\pm 0,01$	1,436 $\pm 0,01$	0,913 $\pm 0,01$	0,592 $\pm 0,01$	0,278 $\pm 0,01$	0,063 $\pm 0,01$

(представлены средние оптические плотности при 450 нм трех определений с указанным стандартным отклонением)

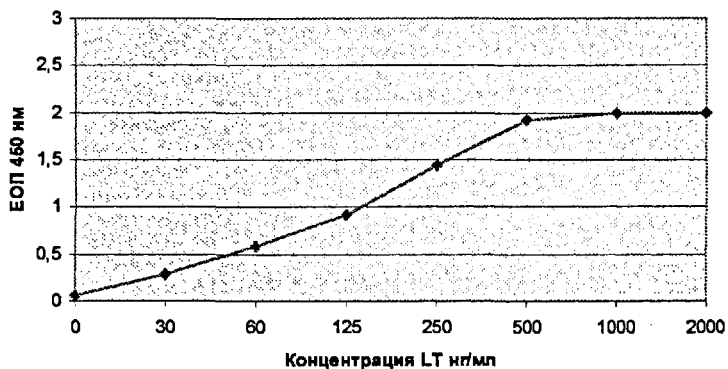


Рис. 11 Калибровочная кривая для определения LT двухцентровым двухступенчатым ИФА
ЕОП- единицы оптической плотности

Калибровочная кривая в диапазоне от 30 до 1000 нг LT имеет линейный характер.

Оптимизация условий постановки иммуноферментного анализа

При проведении иммуноферментного анализа лимитирующим является ряд условий, таких как концентрация мкАт при адсорбции на пластике, значение pH при сорбции мкАт на иммунологические планшеты, рабочее разведение конъюгата мкАт, проявляющий раствор, температура и временные параметры различных стадий иммунохимической реакции.

Мы установили, что оптимальной концентрацией мкАт при сорбции на планшеты является 10 нг/мл, pH посадочного буфера - 3,2, а температурный режим 37 °С. В качестве проявляющего раствора мы использовали тетраметилбензидин. Время инкубации исследуемых проб и конъюгата составило 30 минут, инкубация с проявляющим раствором 10 минут.

В качестве отрицательного контроля использовали фосфатный буферный раствор, в качестве калибровочных точек использовали полученный и очищенный нами термолabileный энтеротоксин.

Аналитические параметры иммуноферментной тест-системы на LT

Чувствительность тест-системы – это наименьшее количество анализируемого вещества, определяемого с помощью данного набора, которое статистически достоверно, отличается от величины оптической плотности отрицательной пробы, не содержащей анализируемого соединения (Тигранян Р.А., 1994).

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum(\overline{ОП}_0 - ОП_0)^2}{n-1}}$$

где: $\overline{ОП}_0$ - среднее арифметическое значение оптической плотности отрицательного контроля;
 $ОП_0$ - значение оптической плотности каждого измерения для отрицательного контроля;
 n - число измерений

Для штаммов определение концентрации LT составляет менее 6 нг/мл.

Под специфичностью понимали способность данной иммуноферментной тест-системы определять только то соединение, для определения которого

эта система предназначена. Специфичность проверяли путем постановки ИФА с другими типами энтеротоксинов микроорганизмов. Получить положительный результат с этими токсинами не удалось (табл. 6)

Таблица 6 - Специфичность тест-системы LT-ИФА

№	Энтеротоксины	Результат реакции	Оптическая плотность $M \pm m$
1	ST I	-	0,051±0,002
2	ST II	-	0,054±0,001
3	Шига подобный токсин I типа	-	0,068±0,001
4	Шига подобный токсин II типа	-	0,055±0,001
5	Положит. контроль LT (C ~ 125 нг)	+	0,732±0,002
6	Отрицат. контроль (C _{LT} - 0)	-	0,057±0,001

ST I и ST 2 – термостабильные энтеротоксины эшерихий.

Из таблицы видно, что все исследуемые энтеротоксины, кроме положительного контроля, показали отрицательный результат в иммуноферментном анализе. Оптическая плотность энтеротоксинов достоверно отличалась от положительного контроля ($P > 0,999$).

Определение термолабильного энтеротоксина при помощи иммунохроматографического анализа

После разработки ИФА тест-системы для определения термолабильного энтеротоксина следующим этапом нашей работы была разработка иммунохроматографического теста для качественного определения термолабильного энтеротоксина в исследуемых образцах. В работе использовались четыре мкАт K^1_3 , K^9_4 , K^{15}_4 , K^4_3 , которые были адсорбированы на нитроцеллюлозную мембрану (Millipore, США), два мкАт K^9_4 , K^4_3 были конъюгированы с коллоидным золотом и использовались в качестве красителя для проявления иммунологической реакции (рис.12). Антимышиный конъюгат наносился на нитроцеллюлозную мембрану в

качестве контроля. В результате проведенных экспериментов ЛТ в ИХА определялся в более высоких концентрациях, нежели в ИФА.

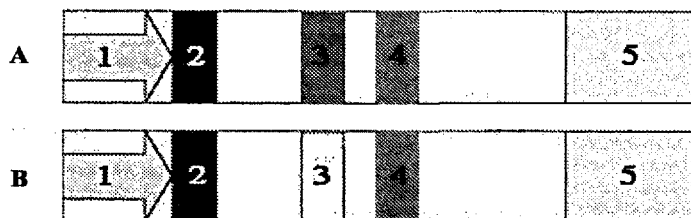


Рис. 12 Определение ЛТ иммунохроматографическим анализом

А – положительный результат, В – отрицательный результат. 1 – исследуемый образец, 2 – мкАт конъюгированные с коллоидным золотом, 3 – мкАт против ЛТ, 4 – антимышинные антитела, 5 – нитроцеллюлозная мембрана.

Образование двух визуально видимых полосок свидетельствуют о положительном результате, образование одной полосы об отрицательном результате или низкой чувствительности диагностикума. Так же были проведены сравнительные исследования по определению термоллабильного энтеротоксина в ИФА и ИХА (табл. 7).

Таблица 7 - Результаты сравнение определения ЛТ в ИФА и ИХА

Концентрация ЛТ/нг	ЕОП в ИФА	Определение ЛТ в ИХА
2000	>2000	+
1000	>2000	+
500	1,916 ±0,01	+
250	1,436±0,01	+
125	0,913±0,01	+
60	0,592±0,01	-
30	0,278±0,01	-
0	0,063±0,01	-

ЕОП- единицы оптической плотности

На основании полученных результатов (табл. 7) можно сделать вывод, что иммунохроматографическим анализом можно определить термоллабильный энтеротоксин в концентрации только свыше 60 нг.

Лабораторные испытания иммуноферментной тест системы

Анализ бактериальных штаммов на токсинообразование

В работе использовались лабораторные штаммы различных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, которые были проанализированы в иммуноферментном анализе на токсинообразование.

Приступая к скринингу бактерий с помощью иммуноферментного анализа, необходимо было подготовить используемые образцы к анализу. Для этого штаммы бактерий выращивали в 10 мл LB в течение 18 часов на шейкере при 37 °C, 200 об/мин. Биомассу с целью получения осадка центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин, супернатант отбрасывали, а осадок обрабатывали буфером для экстракции термолabileного энтеротоксина с 12 М мочевиной и лизоцимом.

Полученный таким образом препарат исследовался в иммуноферментном анализе. В 96 луночный планшет Costar (США) с адсорбированными мкАт вносили по 50 мкл положительного контроля (LT – 125 нг\мл) и 50 мкл (LT – 0 нг\мл) отрицательного контроля, во все остальные лунки по 50 мкл исследуемых проб. Планшет накрывали крышкой и термостатировали в течение 30 минут при 37 °C. Затем планшеты 4 раза промывали промывочным буфером в количестве 200 мкл/лунка, тщательно удаляя остатки буфера. Затем вносили конъюгированные антитела в фосфатном буферном растворе, инкубировали 30 минут при 37 °C. После 4-разовой отмывки промывочным буфером вносили проявляющий раствор ТМБ, и после остановки реакции через 10 мин 2М H₂SO₄ спектрофотометрически определяли интенсивность поглощения при 450 нм.

Из 83 проверенных штаммов 18 (22%) дали положительную реакцию, остальные 62 (78%) показали отрицательный результат. Оптическая плотность исследуемых образцов колебалась в пределах от 0,052 до 0,405 ЕОП, что позволяет судить о различном уровне токсигенности изучаемых штаммов. Настоящие результаты соответствуют данным, полученным И.В. Плугиной (2003) в полимеразной цепной реакции.

Обнаружение термолabileного энтеротоксина в биологических образцах

Мы провели исследования по выяснению возможности использования ИФА для обнаружения термолabileного энтеротоксина в биологических образцах и кормах.

По результатам проведенных исследований кормов животного происхождения и проб фекалий установлено, что токсигенные штаммы вне зависимости от уровня продукции ими термолabileного энтеротоксина, хорошо обнаруживались разработанной нами тест-системой (табл. 8).

Таблица 8 - Определение LT в пробах фекалий и кормах иммуноферментным методом

№ опыта	Результат в ИФА	Оптическая плотность в ИФА в пробах фекалий ($M \pm m$)	Оптическая плотность в ИФА в кормах ($M \pm m$)
1	+	0,162±0,001	0,155±0,001
2	+	0,173±0,002	0,190±0,001
3	+	0,138±0,001	0,161±0,001
Положительный контроль	+	0,130±0,001	0,181±0,001
Отрицательный контроль	-	0,059±0,001	0,059±0,001

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о высокой чувствительности иммуноферментной тест-системы при обнаружении термолabileного энтеротоксина в биологических образцах.

Разработка методов быстрой и специфичной диагностики термолabileного энтеротоксина имеет большое значение, особенно для массового скрининга бактериальных штаммов. Тест-система позволяет работать с малым количеством материала. Минимальная определяемая концентрация термолabileного энтеротоксина составляет 6 нг/мл.

Данные, полученные в результате проведенных исследований свидетельствуют о необходимости применения иммуноферментного анализа для обнаружения токсигенной микрофлоры в биологических объектах.

Таким образом, нами впервые была разработана и создана иммуноферментная тест-система на основе оригинальных мкАт для качественного определения термолабильного энтеротоксина в исследуемых образцах. С ее помощью были проведены эксперименты по обнаружению термолабильного энтеротоксина в образцах корма и пробах фекалий. Термолабильный энтеротоксин обнаруживался во всех исследуемых лизатах.

Впервые показана возможность использования мкАт для разработки иммунохроматографической тест-системы с целью быстрого и точного обнаружения LT.

Выводы

1. Модифицированный метод выделения и очистки термолабильного энтеротоксина эперикий делает возможным получение биологически и иммунологически активного энтеротоксина из клеток штаммов супер-продуцента с высокой степенью очистки.
2. Показана возможность использования полученного высокоочищенного термолабильного энтеротоксина для определения иммунологической активности мкАт, иммунизации лабораторных животных, а так же при разработке и производстве иммуноферментной тест-системы.
3. Подобрана специфическая пара мкАт K^4_3 , K^9_4 и впервые разработан на их основе иммунохроматографический диагностикум для качественного определения термолабильного энтеротоксина.
4. Разработана на основе оригинальных мкАт высокочувствительная иммуноферментная тест-система для качественного определения термолабильного энтеротоксина в исследуемых образцах. Чувствительность тест-системы составила 6 нг/мл, специфичность подтверждена в опыте с использованием шигаподобных токсинов I и II типа, а так же термостабильных энтеротоксинов ST I и ST II.

5. Проведенные лабораторные испытания разработанного диагностикума показали его эффективность при определении термолабильного энтеротоксина в лизатах, полученных из коллекции штаммов энтеробактерий. Из 83 исследуемых штаммов энтеротоксин достоверно определен в изолятах 22% штаммов. В образцах кормов и пробах фекалий термолабильный энтеротоксин обнаруживался в 100% случаев.

Практические предложения

1. Предлагаем использовать модифицированную схему для получения и очистки LT-подобных токсинов.
2. Разработанная иммуноферментная тест-система для качественного определения термолабильного энтеротоксина может быть использована в ветеринарной и медицинской практике.
3. Учитывая простоту, воспроизводимость и информативность иммуноферментной тест-системы, рекомендуем ее как доступный и специфичный метод для обнаружения термолабильного энтеротоксина в биологических образцах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Алексанкин А.П. Использование моноклональных антител в разработке иммунохимических методов детекции термолабильного энтеротоксина эшерихий/Алексанкин А.П., Матевосян К.Ш., Пьянкова А.Н., Серебряков С.Н. // Международная научно-практическая конференция "Ветеринарная медицина – 2004", Феодосия. Меж. тематический науч. сборник, 2004, №84, с.814-815.
2. Алексанкин А.П. Иммуноферментная тест-система для определения термолабильного энтеротоксина эшерихий/Алексанкин А.П., Матевосян К.Ш., Белонская О.С., Серебряков С.Н. // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии: Сб. научн. тр. – М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ им К.И. Скрябина, 2004-2005, с. 53-56.
3. Алексанкин А.П. Разработка антитоксического препарата на основе резидентной микрофлоры/Тихонова Н.Б., Плугина И.В., Матевосян К.Ш., Пьянкова А.Н., Серебряков С.Н., Козловская Г.В., Алексанкин А.П., Козловский Ю.Е. // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН, 2005, №1, с 71-72.
4. Алексанкин А.П. Изменение микрофлоры желудочно-кишечного тракта у мышей линий C57BL/6 и BALB/c при холодовом стрессе. Сб. научных трудов/Козловский Ю.Е., Королева О.Е., Матевосян К.Ш., Серебряков С.Н., Трунова Г.В., Алексанкин А.П., Овчарова А.Н., Козловская Г.В., Харламов Р.В. // "Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии" – 2006 г. с. 121-124.
5. Алексанкин А.П. Определение термолабильного энтеротоксина в кормах и фекалиях с помощью иммуноферментной тест-системы/Алексанкин А.П. // Ж. Крол. и звер. 2006. №5. с. 26.
6. A.P. Alexankin. Investigation of pathogenic and immunological properties of *Aeromonas hydrophila* and characteristic analysis of some subcellular components/T.I. Khomyakova, H. Gong, J. Yang, Ch. Dong, T. Song, T. Lin, O.V. Makarova, Yu.E. Kozlovskyi, A.P. Alexankin, S.E. Severin, Yu.N. Khomyakov. // Ж. Молекулярная медицина, 2006. №3 с. 33-38.

Подписано в печать 22.09.2006
Формат 60х90/16
Объём 1.5 п.л.
Тираж 100 экз.
Заказ № 22090616

Оттиражировано на ризографе в ООО «УниверПринт»
ИНН/КПП 7728572912\772801001
Адрес: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 8, кор. 2.
Тел. 125-22-73.
<http://www.univerprint.ru>

