

Н.В.Москалева, мл. научный сотрудник

Белорусский НИИ экспериментальной ветеринарии им.С.Н.Вышеселеского

УДК 619:616-078:619:616.98:579

Диагностика анаэробной энтеротоксемии, вызываемой энтеротоксигенными штаммами *Cl.perfringens* типа А, в реакции встречного иммуноэлектроосмосфореза (ВИЭОФ)

*В статье приведены данные по отработке оптимальных условий постановки реакции ВИЭОФ для диагностики анаэробной энтеротоксемии телят. Исследованиями установлено, что ВИЭОФ является специфичным, высокочувствительным экспресс-тестом диагностики анаэробной энтеротоксемии телят, обусловленной энтеротоксином *Cl.perfringens* типа А, а по параметру чувствительности превосходит РН на белых мышах на 26%.*

*The article provides the data on developing the optimal conditions for the counter immune electroosmophoresis to diagnose anaerobic enterotoxemia of calves. The research established that the counter immune electroosmophoresis is a specific, highly sensitive express test for the diagnosis of anaerobic enterotoxemia of *Cl.perfringens* type A and it also has 26% higher sensitivity than the neutralization test, which was proved on the tests with white mice.*

Среди лабораторных методов диагностики анаэробной энтеротоксемии телят ведущее место занимает классический бактериологический метод с последующей постановкой реакции нейтрализации токсина на белых мышцах. Однако частота положительных результатов бактериологического обследования больных животных, у которых диагноз на энтеротоксемию поставлен на основании клинико-эпизоотических и патологоанатомических данных, не превышает 20-25%. Поэтому наряду с необходимостью совершенствования бактериологического метода диагностики очевидна целесообразность разработки иных методов, которые обеспечат постановку этиологического диагноза в максимально сжатые сроки.

С целью обнаружения и количественного определения энтеротоксина *Cl. perfringens* типа А апробировано несколько биологических и серологических методов исследования [4, 5, 7, 9]. Ряд исследователей [1, 2] к числу таких методов относят встречный иммуоэлектроосмосфорез.

Антигенная специфичность энтеротоксина *Cl. perfringens* типа А не совпадает со специфичностью других токсинов, вырабатываемых этим же микроорганизмом. Антигела к другим токсинам, присутствующие в диагностических антисыворотках к *Cl. perfringens* типов А, В, С, Д и Е, не оказывали нейтрализующего эффекта на энтеротоксин [8].

Учитывая недостаточную изученность методов лабораторной диагностики энтеротоксемии, вызванной энтеротоксигенными штаммами *Cl. perfringens* типа А, и отсутствие в стране диагностикумов, наши исследования были направлены на разработку способов получения высокоэффективного и специфического диагностикума.

Для получения концентрированного анаэробного энтеротоксина использовали метод высаливания сернокислым аммонием. Надосадочную жидкость фракционировали на сефадексе Г-200. Гель-фильтрацию осуществляли на колонке диаметром 2,5 см при высоте столба геля 90 см. Колонку уравнивали 0,02 М фосфатным буфером рН 7,0, элюцию производили тем же буфером со скоростью вытекания 10 мл/ч, фракции собирали объемом по 5 мл. Выход белка во фракциях устанавливали методом спектрофото-

метрии при длине волны 280 нм. В препаратах энтеротоксина на всех этапах очистки определяли белок, биологическую активность (ДЛМ/мл), а также количество белковых и антигенных компонентов.

Диагностическую сыворотку к энтеротоксину *Cl. perfringens* типа А получали по методу, разработанному А.Ф. Дерезой [3].

Результаты исследований, которые представлены в таблице 1, показали, что нативный энтеротоксин (экстракт спорулирующих клеток) содержал 170 мг белка, а его биологическая активность составляла 75 ДЛМ/мл.

В процессе осаждения сульфатом аммония практически весь энтеротоксин переходил в осадок, а большинство балластных белков (до 70% от общего количества белка нативного энтеротоксина) не осаждалось при данных условиях. Таким образом, на данном этапе очистки происходила значительная концентрация энтеротоксина, который освобождался от большей части сопутствующих белков, что совпадало с данными зарубежных авторов [6].

Надосадочные жидкости после первого растворения преципитата содержали значительную часть оставшихся балластных белков и лишь небольшое количество энтеротоксина. Основная часть энтеротоксина (в среднем 76,7% по биологической активности) переходила в надосадочные жидкости после второго растворения преципитата.

Дифференцированное растворение преципитата приводило к увеличению концентрации и значительной очистке токсина. В препаратах, полученных после вторичного растворения преципитата, обнаруживали 3-4 белковых и 2-3 антигенных компонента, в то время как в нативном энтеротоксине — 13-16 и 10-11 соответственно.

На данном этапе очистки выход энтеротоксина по биологической активности составлял в среднем 78,5%.

При гель-фильтрации белок во фракциях элюировался тремя пиками (рис. 1).

Фракции первых двух асимметричных малых пиков были биологически неактивны и не реагировали в реакции ВИЭОФ. Биологической активностью обладали фракции большого симметричного последнего пика. При ана-

Таблица 1. Характеристика препаратов энтеротоксина *Cl. perfringens* типа А на различных этапах очистки

Препараты энтеротоксина	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Содержание белка, мг	Биологическая активность			Число компонентов в ВИЭФ
				ДЛМ/мл	ДЛМ/мг белка	выход, % от исход. препарата	
Экстракт спорулирующих клеток (нативный энтеротоксин)	100	1,70	170,0	75	44,0	100,0	До 12
Супернатант после первого растворения преципитата	8	3,20	25,6	100	31,2	11,0	До 8
Препарат после второго растворения преципитата	10	1,70	17,0	600	353,0	80,0	2-3
Биологически активные фракции, объединенные после гель-фильтрации	35	0,33	11,6	125	375,0	58,3	1

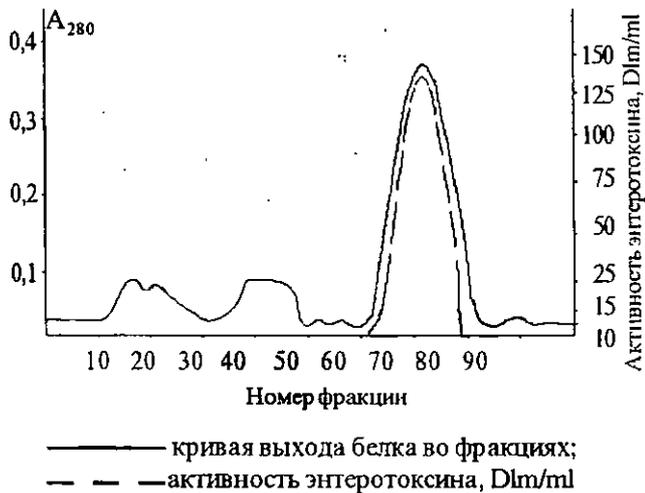


Рис. 1. Гель-фильтрация препарата энтеротоксина, полученного после второго растворения преципитата, на сефадексе Г-200

лизе фракций этого пика мы обнаруживали только один белковый и антигенный компонент.

После объединения максимальных фракций последнего пика с активностью не ниже 50 ДЛМ/мл были получены 4 серии препаратов гомогенного энтеротоксина, удельная активность которого составляла 347,0-365,9 ДЛМ/мг белка. Выход энтеротоксина по биологической активности составил от 50,1 до 67,9%.

При исследовании энтеротоксина, содержащего от 50 до 100 мкг белка, методом ВИЭОФ в 1%-ном геле, состоящем из агарозы "Sigma" и агара "Difco" в соотношении 3:2, последний мигрировал одной полосой. Препараты очищенного энтеротоксина образовывали одну линию преципитации в реакции ВИЭОФ с сывороткой, приготовленной нами к нативному энтеротоксину.

Таким образом, нами были получены препараты антигенно и электрофоретически гомогенного энтеротоксина *C. perfringens* типа А. Исследования показали, что для этого препараты, полученные после осаждения сульфатом аммония и дифференцированного растворения преципитата, достаточно подвергать однократной гель-фильтрации на сефадексе Г-200.

При встречном электрофорезе можно выявить и идентифицировать только такие антигены, которые отличаются по электрофоретической подвижности и к которым имеется моноспецифическая преципитирующая сыворотка.

В связи с этим представляла интерес экспериментальная разработка метода ВИЭОФ с полученным нами очищенным антигеном и моноспецифической антиэнтеротоксической сывороткой с целью обнаружения энтеротоксина *C. perfringens* типа А.

В реакции использовали агарозу "Sigma" и агар "Difco" в соотношении 3:2 в 100 мл веронал-мединалового буфера с ионной силой 0,2 и рН 8,6.

Установлено, что электрофорез как в агаровом геле, так и в гелях, состоящих из равных частей агарозы и агара «Difco», описанных выше, при силе тока 15 мА не приводил к образованию преципитатов в течение времени свыше трех часов. А при силе тока 30 мА линии преципитации можно было обнаружить к концу 2-го часа реакции лишь у лунок с неразведенным энтеротоксином. Повышение силы тока до 40 мА позволило сократить продолжительность электрофореза до 2-3 часов. При данном режиме электрофореза в агаровом геле линии преципитации с неразведенным энтеротоксином появляются в разведениях до 1:16 и 1:32. Более длительный электрофорез не повышал чувствительности реакции.

Из таблицы 2 видно, что при использовании 1%-ного геля агара «Difco», геля, состоящего из 2-х частей агарозы и 3-х частей агара, геля из равных частей агарозы и агара были зарегистрированы линии преципитации, но при меньших разведениях энтеротоксина. Однако электрофорез в 1%-ном геле, состоящем из агарозы и агара «Difco» в соотношении 3:2, позволял обнаружить линии преципитации с неразведенным энтеротоксином через 2 часа, а спустя 2,5-3 часа выявлялись с токсином в разведениях до 1:64, при этом линии преципитации отличались четкостью, были тонкие, трапециевидные, расположенные строго посередине между лунками с антигеном и специфической сывороткой. Более длительный электрофорез не приводил к повышению чувствительности реакции.

Известно, что на результаты ВИЭОФ существенно влияют буферные растворы, используемые для проведения реакции. Поэтому мы испытали два вида веронал-мединаловых буферных растворов (первый — с ионной силой 0,1; второй — с ионной силой 0,2), 0,15 М физиологический раствор NaCl, фосфатно-буферный раствор (рН 7,2), на которых готовили гели.

При сравнении результатов реакции (табл.3) было установлено, что использование гелей на 0,15 М NaCl, фосфатно-буферном растворе позволило получить четкие линии преципитации при низких разведениях энтеротоксина и слабые линии преципитации — при дальнейших разведениях. При постановке ВИЭОФ на веронал-меди-

Таблица 2. Результаты реакции ВИЭОФ в зависимости от использованного геля

Гель (среда-носитель)	Разведение энтеротоксина, ДЛМ/мл							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
1%-ный агар "Difco"	+	+	-	-	-	-	-	-
Агароза "Sigma" и агар "Difco" в соотношении 1:1	+	+	+	-	-	-	-	-
Агароза "Sigma" и агар "Difco" в соотношении 2:3	+	+	+	+	+	-	-	-
Агароза "Sigma" и агар "Difco" в соотношении 3:2	+	+	+	+	+	+	-	-

Таблица 3. Результаты реакции ВИЭОФ в зависимости от использованного буфера

Буфер	Разведение энтеротоксина, ДЛМ/мл							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Веронал-мединаловый, ионная сила 0,1	+	+	+	+	±	-	-	-
Веронал-мединаловый, ионная сила 0,2	+	+	+	+	+	+	-	-
0,15 М NaCl	+	+	±	±	-	-	-	-
Фосфатный	+	+	±	±	-	-	-	-

Примечание. + — четкие линии преципитации;
± — слабые линии преципитации;
- — отсутствие линии преципитации

наловых буферах с ионной силой 0,1 и 0,2 линии преципитации были наиболее четкими, а титры преципитатов максимальными при использовании буфера с ионной силой 0,2.

Среди испытанных режимов электрофореза лучшим оказался при силе тока 40 мА, который нами применялся в дальнейшем.

Приготовленные и испытанные в ВИЭОФ компоненты диагностического набора были лиофильно высушены. Все приготовленные компоненты набора обладали специфичностью. Активность полученных препаратов оставалась практически неизменной на протяжении 12 месяцев хранения при температуре +2-+10 °С.

Таким образом, результаты исследований показали, что наиболее высокая чувствительность реакции ВИЭОФ достигается при использовании 1%-ного геля, состоящего из 3-х частей агарозы "Sigma", 2-х частей агара "Difco", применении веронал-мединалового буфера с ионной силой 0,2 А (рН 8,6) при силе тока 40 мА.

О чувствительности ВИЭОФ судили по удельному весу положительных результатов в общей сумме случаев положительного диагноза на энтеротоксемию, подтвержденного в РН на белых мышцах. Параметр специфичности реакции определяли путем выделения частоты

случаев положительных реакций регистрируемых при постановке ВИЭОФ с пробами фекалий 28 здоровых и 173 больных энтеритом телят, в том числе с 36 пробами фекалий телят, у которых диагноз на энтеротоксемию, обусловленную энтеротоксином *Cl. perfringens* типа А, был подтвержден в РН на белых мышцах.

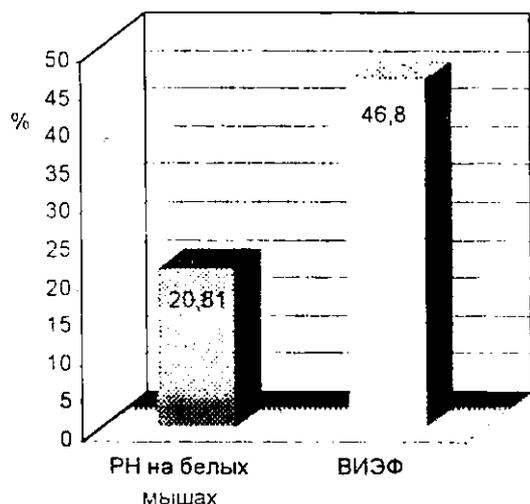
Как видно из таблицы 4, в которой суммированы результаты исследований, пробы фекалий, взятые от здоровых телят как по РН на белых мышцах, так и в реакции ВИЭОФ, дали отрицательные результаты.

При исследовании в реакции ВИЭОФ 36 проб фекалий телят, больных анаэробной энтеротоксемией, обусловленной энтеротоксином *Cl. perfringens* типа А, что было подтверждено в РН на белых мышцах с применением специфической сыворотки, во всех случаях получены совпадающие результаты. В контрольных пробах фекалий, взятых от телят, больных колибактериозом, трансмиссивным вирусным гастроэнтеритом, ротавирусной инфекцией и анаэробной энтеротоксемией, обусловленной альфа-токсином, энтеротоксина *Cl. perfringens* типа А не обнаружено. Это указывает на высокую специфичность реакции ВИЭОФ для обнаружения энтеротоксина *Cl. perfringens* типа А.

При исследовании в реакции ВИЭОФ 173 проб центрифугатов фекалий больных телят с признаками диареи

Таблица 4. Диагностическая эффективность ВИЭОФ для выявления энтеротоксина *Cl. perfringens* типа А в центрифугатах содержимого тонкого отдела кишечника павших и фекалиях больных телят

Наименование хозяйства	Исследовано телят	Клиническое состояние телят	Выявлен энтеротоксин <i>Cl. perfringens</i> типа А			
			ВИЭФ	%	РН	%
К-з "Правда" Лиозненского р-на	65	больные	25	38,5	12	18,46
С-з "Горняк" Солигорского р-на	40	- // -	14	35,0	6	15,0
С-з "Рыдомольский" Толочинского р-на	14	- // -	8	57,1	4	28,6
К-з "Заболотье" Мстиславского р-на	12	- // -	6	50,0	2	16,7
К-з "Красный берег" Жлобинского р-на	11	- // -	4	36,4	2	18,2
К-з им. Ленина Рогачевского р-на	10	- // -	7	70,0	3	30,0
К-з "Новая жизнь" Дятловского р-на	9	- // -	7	77,8	4	44,4
С-з "Вороново" Вороновского района	8	- // -	6	75,0	3	37,5
С/к "Западный" Брестского р-на	4	- // -	2	50,0	-	-
Всего	173	- // -	81	46,8	36	20,8
с-з им. Ульянова Минского р-на	28	здоровые	-	-	-	-



Выявлен энтеротоксин *Cl. perfringens* типа А

Рис. 2. Диагностическая эффективность ВИЭОФ для выявления энтеротоксина *Cl. perfringens* типа А в центрифугатах содержимого тонкого отдела кишечника павших и фекалиях больных телят

(рис. 2) в 81 (46,8%) пробе обнаружен энтеротоксин *Cl. perfringens* типа А. При постановке РН на белых мышах с указанными пробами положительные результаты были получены только в 36 случаях (20,8%). Это свидетельствует о более высокой чувствительности ВИЭОФ по сравнению с РН на белых мышах при определении энтеротоксина *Cl. perfringens* типа А и позволяет проводить массовое обследование животных в короткие сроки.

Однако, как это видно из таблицы 4, частота выявления энтеротоксина в различных хозяйствах значительно колебалась. Если от телят колхоза "Новая жизнь" Дятловского района он выявлялся в 77,8% случаев, то из фекалий телят совхоза "Горняк" Солигорского района энтеротоксин *Cl. perfringens* типа А обнаружен в 35% случаев. Несмотря на выявленные колебания положительной реакции, данные по ВИЭОФ коррелировали с результатами РН на белых мышах, хотя процент выявления в РН был 26,0%, ниже, чем в реакции ВИЭОФ.

Расхождения в результатах постановки ВИЭОФ, полученных при исследовании фекалий телят, мы предполагаем, связаны с интенсивностью эпизоотического процесса и сроками отбора материала для исследований, так как энтеротоксин *Cl. perfringens* типа А подвержен высокой лабильности.

При титрации испытуемого материала от заведомо больных телят четкие линии преципитации с иммунной сывороткой к энтеротоксину *Cl. perfringens* типа А получали в разведении 1:16-1:64. Поэтому титр 1:4 являлся рабочим разведением для обнаружения энтеротоксина в реакции ВИЭОФ.

На основании проведенных исследований нами разработан набор для диагностики анаэробной энтероток-

семи, обусловленной энтеротоксином *Cl. perfringens* типа А, включающий очищенный, концентрированный анаэробный энтеротоксин *Cl. perfringens* типа А, с удельной активностью 369-385 ДЛМ/мкг белка, специфическую гипериммунную антиэнтеротоксическую сыворотку с титром антиэнтеротоксинов 0,5 АЕ в 1 мл, нормальную сыворотку крови здоровых телят, агар "Difco" и агарозу "Sigma".

Выводы

1. Наибольшая концентрация и очистка энтеротоксина от большей части сопутствующих белков достигались за счет его осаждения сульфатом аммония 80% насыщения с рН 7,0 при температуре 4 °С в течение 12-14 часов с последующим двукратным дифференцированным растворением, центрифугированием преципитата и гель-фильтрацией на сефадексе Г-200.

2. Оптимальными условиями постановки реакции ВИЭОФ являются применение веронал-мединалового буфера с рН 8,6 и ионной силой 0,2 А, геля состоящего из 2-х частей агара "Difco" и 3-х частей агарозы "Sigma" при силе тока 40 мА и напряжении 15-30 вольт.

3. Реакция ВИЭОФ является специфичным, высокочувствительным тестом диагностики анаэробной энтеротоксемии телят, обусловленной энтеротоксином *Cl. perfringens* типа А, а по параметру чувствительности превосходит РН на белых мышах на 26%.

Литература

1. Бакулин И.Н. Энтеропатогенный фактор *Cl. perfringens* типа А: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук, Москва. - 1982. - 23с.
2. Гудков В.Г., Рьпик П.Г., Полякова М.И. Способы повышения чувствительности метода встречного иммуноэлектрофореза при диагностике вирусных инфекций // *Вопр. вирусол.* - 1985. - № 4. - С. 486-488.
3. Дезеа А.Ф. Получение диагностической сыворотки антиэнтероперфрингенс типа А // *Ветеринарная наука - производству: Межвед. сб. / БелНИИЭВ.* - Минск, 1988. - Т. 26. - С. 65-67.
4. Сидорчук А.А. Реакция иммунофлуоресценции при клостридиозах животных // *Тр. Всесоюзного института экспериментальной ветеринарии.* - Москва, 1985. Т. 63. - С. 84-89.
5. Genigeorgis C. et al., Assay methods for *Cl. perfringens* type A enterotoxin // *Appl. Microbiol.* - 1973. - V. 26, - № 1. - P. 111-115.
6. Granum P.E., Whitaker J.P. Improved Method for Purification of enterotoxin from *Cl. perfringens* type A // *Appl. Environment. Microbiol.* - 1980. - V. 39, № 6. - P. 1120-1122.
7. Hauschild A.H.W., Hilscheimer R. Purification and characteristics of the enterotoxin of *Cl. perfringens* type A // *Canad. J. Microbiol.* - 1971. - V. 17, № 11. - P. 1425-1433.
8. Stark R.L., Duncan Ch.L. Biological characteristics of *Cl. perfringens* type A enterotoxin // *Infect. Immun.* - 1971. - V. 4, - № 2. - P. 89-96.
9. Uemura T. et al., Biological assay for *Clostridium perfringens* enterotoxin with vero cells // *Japan. J. veter. Sc.* - 1984. - Т. 46, № 5. - P. 715-720.