



ЖИВОТНОВОДСТВО И ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

Н.Н.Андросик, академик ААН РБ, доктор ветеринарных наук, профессор

А.П.Лысенко, доктор ветеринарных наук, профессор

А.Ю. Финогенов, аспирант

Белорусский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Н.С. Вышелесского

Л.П.Титов, доктор медицинских наук, профессор

Н.В.Лебедева, младший научный сотрудник

Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии

УДК 619:615.373

Метод получения диагностической анитоксической сыворотки к токсину A Clostridium difficile

Clostridium difficile часто является причиной антибиотико-ассоциированных диарей людей и животных. Нами получена диагностическая анитоксическая сыворотка с высокой чувствительностью и специфичностью, пригодная для создания диагностических систем. Сыворотка обладает иммунной однородностью по отношению к 26 эпизоотическим штаммам *Clostridium difficile* и не дает перекрестных реакций с 19 видами других микроорганизмов. В реакции ИФА имеет титр 1:25 000, а в реакции нейтрализации на белых мышах 3,2 АЕ.

Clostridium difficile is often the reason for antibiotics associated diarrhea of humans and animals. We got the diagnosis anti toxic serum highly sensitive and specific, suitable for creating diagnosis systems. The serum has immune uniformity to the 26 epizootic cultures of *Clostridium difficile* and does not cause cross reactions with 19 kinds of other microorganisms. In IFA reaction it has the ration 1:25000 and in the reaction of neutralization on white mice has the activity of 3,2AE.

Введение

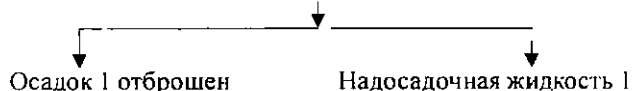
В последние годы в результате широкого применения противомикробных средств участились случаи антибиотико-ассоциированных диарей, этиологическим фактором которых является *Clostridium difficile*. Кроме того, этот микроорганизм является часто причиной гибели животных, не лечившихся ранее антибиотиками, особенно новорожденных. Факторами патогенности этого микроорганизма являются два токсина – энтеротоксин (Mг 308 kDa) и цитотоксин (Mг 270 kDa). Однако в связи с тем, что бактериологические методы диагностики весьма затруднительны (является строгим анаэробом, требует специальных дорогостоящих сред), этот микроорганизм в нашей стране ранее не выделялся. Поэтому целью нашей работы было создание надежной диагностической системы для его быстрой идентификации.

Материалы и методы

Культивирование микроорганизма проводили в среде brain heart infusion (фирмы Becton Dickinson). Для этого к 360 мл среды добавляли 40 мл микробной суспензии (в трех колбах емкостью 500 мл). Использовалась микробная суспензия с концентрацией микробных клеток соответствующей стандарту мутности 6 по McFarland, что равно $1,8 \times 10^9$ микробных клеток в 1 мл. Засев проводили референс-штаммом *Clostridium difficile* VPI 10463. Инкубирование осуществляли в анаэробных условиях (1 анаэ-

ростат фирмы bioMerieux, 2 анаэрогата фирмы BBL, системы "Анаэропак H₂ + CO₂") в термостате при 37 °С.

Вегетативные клетки *C. difficile* осаждали центрифугированием при 8000 об./мин. 15 мин. (центрифуга ОПн – 8УХЛ 4.2, с воздушным охлаждением).

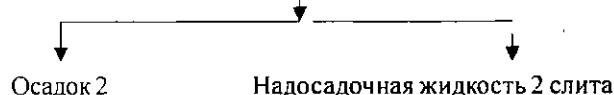


Для концентрирования токсина проводили осаждение токсинотоксина из культурального супернатанта (использовалась надосадочная жидкость 1) методом высаливания сульфатом аммония до 40 % насыщения.

Количество (г) сульфата аммония, которое нужно добавить к 1 л раствора при 20 °С, чтобы из раствора с насыщением S1% получить раствор с насыщением S2%, рассчитывали по формуле

$$533(S2 - S1) / (100 - 0,3 S2).$$

Осадок 2 отделяли на центрифуге при 8000 об./мин. в течение 15 мин.



Осадок 2 отмывали в 5 мл забуференного физиологического раствора (на 1000 мл физиологического раствора добавляли 20 мл

1 М калийфосфатного буфера). Для освобождения материала от избытка солей сульфата аммония проводили диализ против забуференного физраствора (80 мл) в диализном целлофане (Sigma) в течение 12 часов. Концентрирование жидкости из диализного мешка осуществляли с использованием ПЭГ – 6000 до объема 3 мл.

Гель-фильтрацию проводили на системе LKB Bromma 2238 UVICORDS II на сефадексе G-200. Элюировали колонку забуференным физиологическим раствором.

Параметры гель-фильтрации: количество пульсов – 10; время – 18,0; объем одной фракции – 4,5 мл; скорости гель-фильтрации 18 мл в час и 6,9 мл ч /см².

Оптическую плотность измеряли на приборе Ultrospec 1000 фирмы Pharmacia Biotech.

Летальную активность определяли на белых мышах массой 14 – 16 г. Мышам вводили внутривенно (в хвостовую вену) по 0,5 мл материала. Срок наблюдения за животными составил 3 суток. В группе было 4 мыши.

Обнаружение цитотоксического действия (ЦТД) проводили на культуре клеток VERO на микроплашках в CO₂ инкубаторе. В качестве ростовой и поддерживающей среды использовалась "Игла", для отмывки плашек применяли раствор Хэнкса. Прорастание микробных клеток ингибировали добавлением гентамицина в концентрации 40 мкг/мл. Посевная доза клеток составляла 200000 клеток в 1 мл (20000 клеток в 1 ячейке). Окончательный учет результатов проводили через 72 часа, контроль без смены ростовой среды.

В качестве материала для иммунизации нами были отобраны три фракции с наиболее выраженной летальной и цитотоксической активностью и вызывающие характерные дегенеративные изменения на культуре клеток.

Способ обезвреживания токсина формальдегидом до 0,4% конечной концентрации оказался непригоден. Титр сыворотки при использовании этого способа в реакции ELISA составил всего 1:320-1:640. Поэтому нами был выбран щадящий способ обезвреживания материала в присутствии 1% раствора лизина формальдегидом до 0,4% конечной концентрации. При этом на первой обратимой стадии формальдегид взаимодействовал со свободными Σ-аминогруппами лизина с образованием метилоламинных групп. На второй необратимой стадии активные радикалы циклических аминокислот, содержащие фенольные, гуанидиновые, амидазольные и индольные группы (тирозин, аргинин, гистидин и триптофан), за счет активных атомов водорода прочно соединялись с метилоламинными группами через метиленовые мостики.

Для этого мы проводили следующие этапы обработки:

- добавляли к материалу лизин до 1 % концентрации; готовили 10%-ный раствор, который фильтровали через фильтр Millex -GS (Millipore) с диаметром пор 0,22 мкм;
- готовили 1%-ный раствор формальдегида;
- 1%-ный раствор формальдегида добавляли в материал в конечной концентрации 0,4%;
- материал помещали в термостат при 37 °С и выдерживали в течение 3 суток.

Общий объем после этапа вышеуказанной обработки составил 15,4 мл: материал (объединенная фракция из проб-

рок 15+16+17) – 10 мл, лизин – 1,4, формальдегид – 4 мл.

Материал (общий объем) смешивался с адьювантом (эмульсигеном производства США) в соотношении 1 часть материала и 2 части адьюванта.

В опыте по иммунизации использовали 4 кролика породы шиншилла массой ≈3 кг.

Количество вводимого материала на 1 инъекцию на 1 животное составляло 500 мкг белка в объеме 2 мл (материал (0,49 мл)+ лизин + формальдегид + адьювант). Материал вводили внутримышечно в четыре точки в конечности. Животные были разделены на две группы. Первой группе проведен цикл иммунизации из 5 инъекций с интервалом 1 неделю, второй – из 11 инъекций с интервалом 1 неделю.

Для постановки реакции нейтрализации токсин разводили физиологическим раствором с таким расчетом, чтобы в 0,25 мл содержалось 10 ДЛМ токсина. Сыворотку крови разводили физраствором 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 и т.д. и 0,25 мл разведенной сыворотки смешивали с 0,25 мл раствора токсина, содержащего 10 ДЛМ. Смесь сыворотки с токсином ставили при температуре 37 °С на 45 минут для нейтрализации, затем вводили внутривенно 4 белым мышам.

Для удаления из сыворотки низкомолекулярных белковых компонентов проводили осаждение иммуноглобулинов сульфатом аммония до 33% насыщения с последующим диализом. Осажденные иммуноглобулины разводили в двукратном объеме физраствора.

Реакцию ELISA ставили на 96 луночных панелях по общепринятой методике.

Результаты

Максимум токсинообразования наблюдался на 5-6-й день (рис. 1), что подтверждает исследования ряда авторов.

В ходе гель-фильтрации на сефадексе G-200 (рис. 2) нативный токсин элюировал в виде двух пиков.

Для обнаружения наиболее биологически активных фракций нами были поставлены опыты на культуре клеток и белых мышах.

Таблица 1. Летальная активность очищенного и нативного токсинов

Разведение материала	Гибель мышей (голов) на 1 мл токсина	
	Нативный токсин-нокомплекс	Объединенная фракция из проб-рок (15 + 16 + 17)
1:2	4	4
1:4	4	4
1:8	4	4
1:16	4	4
1:32	4	4
1:64	4	4
1:128	4	4
1:256	4	1
1:512	4	1
1:1024	4	1
1:2048	2	0
1:4096	0	0

Контроль с ростовой средой (brain heart infusion) и забуференным физраствором был отрицателен. Активность нативного токсина составила 1024 минимальных летальных доз (DLM) в 1 мл, а очищенного – 128 DLM в 1 мл.

Контроль ставили с поддерживающей средой, отмывной средой, ростовой средой *C. difficile* (сердечно-мозговым бульоном). Во всех трех случаях контроль был отрицательный.

Титр сыворотки составил в реакции ELISA 1:25 000 в первой группе (5 инъекций) и 1:6 400 во второй группе (11 инъекций), в реакции нейтрализации на белых мышах 3,2 антитоксических единиц (АЕ) в первой группе и 3,6 во второй группе. За 1 АЕ принимали то минимальное количество сыворотки, которое нейтрализовывало 100 минимальных

летальных доз токсина для мышей массой 14-16 г.

В иммунном отношении к другим штаммам *C. difficile* сыворотка в реакции ELISA была однородной (рис.3).

Нами также были изучены перекрестные реакции полученной диагностической сыворотки с другими видами микроорганизмов и питательной средой (табл. 3).

Заключение

С помощью гель-фильтрации на сефадексе G-200 нам удалось получить очищенный токсин *Clostridium difficile* с высокой биологической активностью и на его основе получить диагностическую антитоксическую сыворотку с высокой чувствительностью и специфичностью, пригодную для создания диагностических систем.

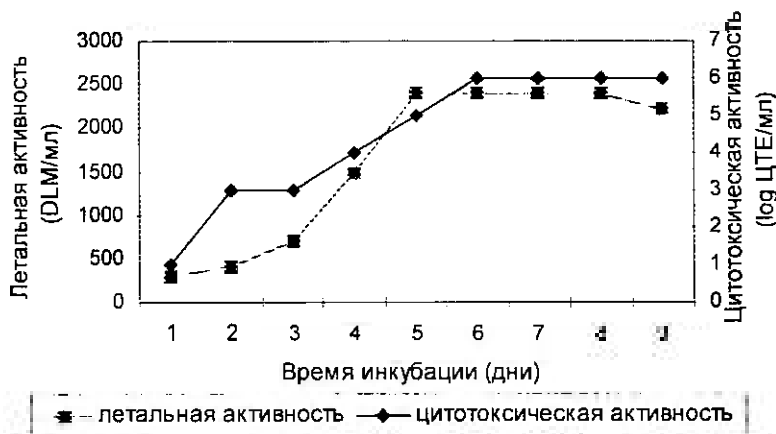


Рис.1. Динамика токсинообразования *Cl. difficile* VPI 10463

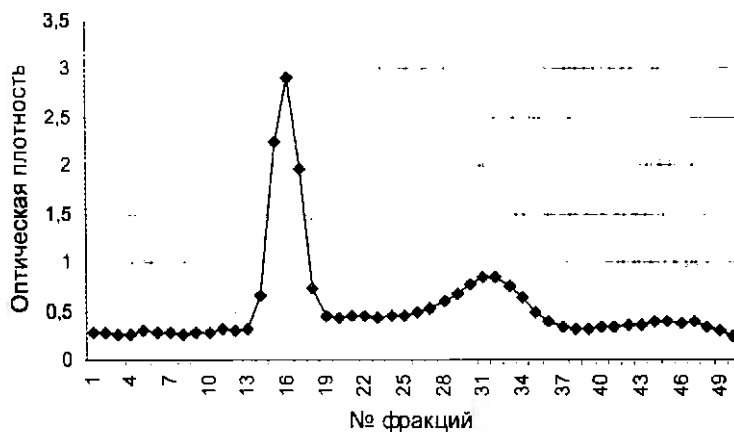


Рис. 2. Оптическая плотность элюатов при λ 280 нм

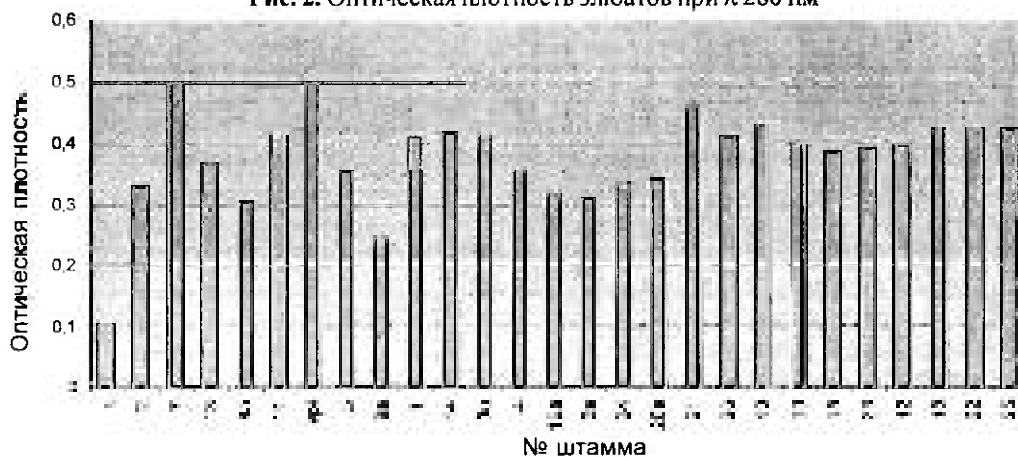


Рис. 3. Иммунная однородность штаммов

Таблица 2. Биологическая активность фракций

Номер пробирки	Оптическая плотность	Содержание белка, мкг/мл	Количество ТЦД ¹ в 1 мл	Lg ТЦД50/мл по методу Кербера	Количество ТЦД на 100 мкг белка	Характер дегенеративных изменений на культуре клеток
Нативный токсиноком.		22000,0	10 ⁶ ТЦД50	6,0	4545,5	типичные
brain heart infusion		24000,0				
5	0,298	600,0	10 ⁴ ТЦД 100	4,5	1666,7	нетипичные
13	0,319	240,0	10 ² ТЦД 100	2,5	41,7	нетипичные
14	0,653	240,0	10 ³ ТЦД 50	3,0	416,7	нетипичные
15	2,26	2125,0	10 ⁴ ТЦД 75	4,5	470,6	типичные
16	2,92	1300,0	10 ⁴ ТЦД 100	4,5	769,2	типичные
17	1,968	1700,0	10 ³ ТЦД 50	5	5882,4	типичные
18	0,732	625,0	10 ⁴ ТЦД 75	4,5	1600,0	смешанный тип
19	0,460	250,0	10 ⁴ ТЦД 75	4,5	4000,0	смешанный тип
24	0,447	900,0	10 ⁴ ТЦД 75	4,5	1111,1	смешанный тип
28	0,598	2125,0	10 ² ТЦД 75	2,5	4,7	смешанный тип
29	0,689	2500,0	10 ² ТЦД 75	2,5	4,0	смешанный тип
30	0,784	2925,0	10 ² ТЦД 100	2,5	3,4	нетипичные
31	0,849	3400,0	10 ² ТЦД 100	2,5	2,9	нетипичные
32	0,847	3425,0	10 ² ТЦД 100	2,5	2,9	нетипичные
33	0,761	3400,0	10 ² ТЦД 100	2,5	2,9	нетипичные
34	0,640	3000,0	10 ³ ТЦД 75	5,5	3333,3	нетипичные
35	0,497	2250,0	10 ³ ТЦД 75	5,5	4444,4	нетипичные
45	0,391	2125,0	10 ⁴ ТЦД 75	4,5	470,6	нетипичные
Объединенная 15+16+17		1025,0	10 ⁵ ТЦД50	5,0	9756,1	типичные

Примечание. ¹ТЦД – тканевые цитопатические дозы

Таблица 3. Перекрестная реакция с другими видами микроорганизмов

Виды микроорганизмов	Оптическая плотность нормальной сыворотки	Оптическая плотность диагностической сыворотки
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,399	0,218
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0,201	0,12
<i>Proteus vulgaris</i>	0,205	0,134
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,254	0,188
<i>Bacillus macer</i>	0,381	0,208
<i>Shigella dysenteriae</i>	0,214	0,147
<i>Haemophilus pleuropneumoniae</i>	0,183	0,148
Нормальная микрофлора кролика	0,272	0,165
ростовая среда	0,189	0,162
<i>Bacillus subtilis</i>	0,382	0,256
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0,298	0,174
<i>Clostridium perfringens</i> тип E	0,141	0,098
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	0,355	0,211
<i>Clostridium septicum</i>	0,432	0,269
<i>Clostridium perfringens</i> тип A	0,223	0,135
<i>Clostridium perfringens</i> тип C	0,163	0,124
<i>Escherichia coli</i>	0,266	0,136
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,145	0,106
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,268	0,111
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,153	0,138
Токсин <i>Cl.difficile</i>	0,169	0,621

Литература

1. Получение диагностической антитоксической сыворотки к *Clostridium difficile* / В.М.Алчинбаева, И.Н.Бакулин, Л.Л.Миронова, Т.И.Сергеева // ЖМЭИ. – 1989. – № 4. – С. 22-24.
2. Третьяков В. А. *Clostridium difficile* – одна из причин энтероколитов у человека // ЖМЭИ. – 1989. – № 9. – С. 102-104.
3. Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbent assay, fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *C.difficile* cytotoxin titer in two patient Cohorts. M.A.Schleupner, D.C.Garner, K.M.Sosmowski et al. // J. of Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33. – № 7. – P. 1755-1759.
4. Development of a rapid enzyme immunoassay for *Clostridium difficile* toxin A and its use in the diagnosis of *C.difficile*-associated disease. J.DiPersio, F.J.Varga, D.L.Conwell et al. // J. of Clin. Microbiol. – 1991. – Vol. 29. – № 12. – P. 2724-2730.
5. Evaluation of four commercially available enzyme immunoassays for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. S.W.Whittier, D.S.Shapiro, W.F.Kelly et al. // J. of Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – № 11. – P. 2861-2865.
6. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* toxin A/B test. D.M.Lyerly, L.M.Neville, D.T.Evans et al. // J. of Clin. Microbiol. – 1998. – Vol. 36. – № 1. – P. 184-190.
7. Toxin A and toxin B of *Clostridium difficile*. M.Wolffhagen, R.Torensma, A.C.Fluit, J.Verhoef // FEMS Microbiol. Rev. – 1994. – Vol. 13. – P. 59-64.