

# ЛАТЕКСНИЙ АНТИТІЛЬНИЙ ДІАГНОСТИКУМ ДЛЯ ІНДИКАЦІЇ ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI*

Харківська державна зооветеринарна академія

Найпоширенішим інфекційним шлунково-кишковим захворюванням людей і молодняка сільськогосподарських тварин, яке спричинюють патогенні *Escherichia coli*, є колібактеріоз (синоніми: ешерихіоз, колібацілоз, колідіарея, коліентерит, «білий пронос», токсична диспепсія), що характеризується виснажливою діареєю, швидким зневодненням організму і явищами токсикозу [1–3].

Розроблені нині методи діагностики колібактеріозу базуються, переважно, на типізації кишкової палички в серологічних реакціях. Проте, за даними світової літератури, один із головних критеріїв оцінки патогенності збудника — наявність у нього генів, що зумовлюють утворення ентеротоксинів: термостабільного (ST) і термолабільного (LT), з експресією яких і пов'язаний розвиток діарейного синдрому при цьому захворюванні [4].

Сьогодні на ринку України й інших європейських країн відсутні сучасні високоефективні діагностикуми, що дозволяють проводити експрес-ідентифікацію ентеротоксигенних *E. coli* за їх основними чинниками патогенності.

Саме тому **мета** досліджень полягала в розробці діагностикума для експрес-ідентифікації ентеротоксигенних *E. coli* за їхньою здатністю продукувати ентеротоксини при діагностиці колібактеріозу.

Суть і новизна розробленого методу полягала в тому, що визначення ентеротоксинів *E. coli* у фекаліях хворих і вмісті кишечника загиблених тварин проводили в реакції аглютинації антигену до кон'югату ентеротоксинів *E. coli*, іммобі-

лізованих на частках монодисперсних полістиролових латексів діаметром 0,31 мкм [5].

## Матеріали та методи дослідження

Для експериментів використовували: монодисперсні полістиролові латекси діаметром 0,31 мкм; фізіологічний розчин (рН 7,0–7,2); гліциновий буфер (рН 8,2); 0,1 М фосфатний буфер (рН 6,8); карбонат-бікарбонатний буфер; 0,5%-й гліцерин; 0,2 М розчин лізину; поліетиленгліколь (ПЕГ) із молекулярною масою 35 000–40 000 D; глутаральдегід ("Reanal", Угорщина); сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеція); предметне скло; хроматографічну колонку 0,9×60 см; магнітну мішалку; термостат; холодильник; спектрофотометр.

Приготування кон'югату здійснювали таким чином: 100 мг ліофілизованого нативного 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, урівноважену 0,15 М розчином хлориду натрію. Фракції, які містили активовані LT (екстинкція при 403 нм), об'єднували і концентрували до 1/10 початкового розчину ПЕГ із молекулярною масою 3000 D. До цього розчину додавали 50 мг ST-ентеротоксину, розчиненого в суміші 10 мл 0,15 М хлориду натрію і 1,0 мл карбонат-бікарбонатного буфера.

Через 24 год інкубації при 4 °С додавали 1,0 мл 0,2 М розчину лізину і на 2 год ста-

вили на діаліз проти 0,1 М фосфатно-сольового буфера. Кон'югат центрифугували 20 хв при 2000 g і зберігали при 4 °С.

Для приготування імунізуючого препарату кон'югат ентеротоксинів змішували з рівними об'ємами повного ад'юванта Фрейнда або 30%-го розчину гідроокису алюмінію, суміш ретельно збовтували і витримували при кімнатній температурі 4 год, повторюючи збовтування через кожні півгодини. Готовий імунізуючий препарат зберігали в холодильнику при 4 °С.

Гіперімунні антитоксичні сироватки крові до кон'югату ентеротоксинів отримували від 11 биків віком 1,0–1,5 роки Червоно-степової породи з дослідного господарства «Українка» Харківського району, благополучного щодо інфекційних захворювань.

Імунізацію проводили двократно з інтервалом 30 днів. Кон'югат вводили внутрішньом'язово, в 2–4 точки, дозою 5,0 і 6,0 мг/мл в об'ємі 5 мл.

На 7-й день після ревакцинації проводили пробне кровопускання (100 мл), отримували сироватку (близько 30 мл) і визначали їх специфічність у реакції дифузійної преципітації. За наявності в сироватці титрів антитоксинів не нижче 1:8–1:16 здійснювали відбір крові. У кожної тварини брали по 5 л крові й отримували 2,8–3,0 л сироватки [6].

Антитоксини, виділені за допомогою імуносорбенту з гіперімунних антитоксичних сироваток крові биків [7], розводили в гліциновому буфері до отримання концентрації 1,2 %, а частки монодисперсних полістиролових латексів — у спів-



відношенні 1:3 гліциновим буфером, рН 8,2.

Змішували рівні об'єми латексів і антитоксинів, суміш витримували впродовж 2 год у термостаті при 37 °С, періодично струшуючи. До суміші додавали дві частини гліцинового буфера, що містив 0,5 % гліцерину. Діагностикум витримували в холодильнику 5 днів при 4 °С, перед застосуванням його збовтували.

У контролі використовували діагностикум, виготовлений з імуноглобулінів нормальної сироватки крові биків, іммобілізованих на латексах.

Індикацію ентеротоксинів *E. coli* проводили у фекаліях здорових і хворих телят, а також у вмісті тонкого кишечника загиблих від колибактеріозу телят. Фекалії та вміст кишечника центрифугували при 4000–5000 г протягом півгодини, збирали супернатант і концентрували його в 5 разів поліетиленгліколем.

Постановку реакції латекс-аглютинації здійснювали таким чином: на знежирене предметне скло наносили і змішували 1 краплю досліджуваної рідини і 1 краплю латексного діагностикума. Облік реакції проводили візуально впродовж 3 хв за 4-бальною шкалою:

++++ — чітка аглютинація часток у прозорій рідині;  
+++ — дрібні скупчення часток у прозорій рідині;  
++ — дрібні скупчення часток у каламутній рідині;  
+ — ледве помітні частки в каламутній рідині;  
- — аглютинація відсутня, рідина рівномірно каламутна.

Позитивною реакцією вважали аглютинацію не менше ніж на ++, при негативному контролі.

В усіх позитивних випадках спостерігалася чітка аглютинація антитоксинів, іммобілізованих на частках латексів у прозорій рідині (++++).

Для визначення титру ентеротоксинів у мікротитраторі «Такачи» готували двократні розведення досліджуваних рідин від 1:2 до 1:128 в об'ємі 0,05 мл. У всі лунки приготова-

них розведень окремо вносили по 0,025 мл розчину антитіл до ST- і LT-ентеротоксинів, іммобілізованих на латексах. Вміст лунок ретельно перемішували шляхом легкого постукування по кутах панелі і залишали на 1 год при 37 °С.

Постановку реакції латекс-аглютинації супроводжували два контролі: для контролю антигену використовували нативний ST-ентеротоксин *E. coli* з концентрацією білка 100 мкг/мл, а для контролю специфічності діагностикума — імуноглобуліни нормальної сироватки крові биків, іммобілізовані на латексах.

### Результати дослідження та їх обговорення

Результати оцінювали за зовнішнім виглядом осаду антитоксинів, іммобілізованих на частках монодисперсних латексів, у лунках. У позитивному випадку, що позначався знаком (+), антитоксини рівномірно, у вигляді «парасольки», вкривали усе дно лунки. При нахилі осад не розпадався або утворював окремі грудочки. При негативному результаті (-) антитіла осідали на дно лунки у вигляді компактної гру-

дочки або кільця в самому центрі лунки. При нахилі осад легко руйнувався з утворенням рівномірної каламуті.

За допомогою латексного діагностикума на основі антитіл до кон'югату ентеротоксинів у фекаліях телят із симптомами діареї та в кишковому вмісті загиблих тварин ідентифікували ST-ентеротоксин *E. coli*. У фекаліях телят його титр становив 1:8–1:16, а в кишковому вмісті — 1:32–1:64.

Латексний діагностикум на основі антитіл до LT-ентеротоксину виявляв LT-ентеротоксин *E. coli* у фекаліях хворих телят у титрах 1:16–1:32, а в кишковому вмісті загиблих телят — 1:32–1:64.

Контроль антигену був позитивним у 100 % випадків (титр 1:64), а контроль діагностикума на основі антитіл нормальної сироватки крові биків — негативним (табл. 1).

Оцінюючи ефективність існуючих і розробленого тесту для індикації ентеротоксинів *E. coli*, встановили, що найбільш специфічний із них — латексний діагностикум на основі антитіл до кон'югату ентеротоксинів порівняно з простим біотестуванням. У

Таблиця 1

Кількість позитивних проб латексних діагностикумів при індикації ентеротоксинів *E. coli* у здорових і хворих на колибактеріоз телят

Метод індикації, досліджуваний матеріал	Кількість позитивних проб діагностикума, $\bar{X} \pm s$ , n=25, %	$P_{д-к} \leq$
Антитіла до кон'югату ентеротоксинів, іммобілізовані на латексах	0	—
Фекалії здорових телят (контроль)	79,3±5,2	0,05
Фекалії хворих телят	85,3±3,7	0,05
Вміст кишечника хворих телят	100,0	—
Контроль антигену	100,0	—
Антитіла до LT-ентеротоксину, іммобілізовані на латексах	0	—
Фекалії здорових телят (контроль)	15,0±4,0	0,05
Фекалії хворих телят	21,4±5,5	0,05
Вміст кишечника хворих телят	100,0	—
Контроль антигену	100,0	—
Антитіла нормальної сироватки крові, іммобілізовані на латексах	0	—
Фекалії здорових телят (контроль)	0	—
Фекалії хворих телят	0	—
Вміст кишечника хворих телят	0	—
Контроль антигену	0	—



біотестах спостережуваний ефект завжди залежить від індивідуальної чутливості біологічних об'єктів не тільки до ентеротоксинів, але і до інших умов проведення досліду. Ці тести неможливо застосовувати безпосередньо в зонах масових шлунково-кишкових захворювань, вони є трудомісткими, дорогими, важковідтворюваними, часто неспецифічними, недостатньо чутливими, а більшість із них не відповідає етичним нормам щодо тварин.

Використання існуючих серологічних методів потребує тривалого часу (24–48 год), що призводить до запізнення результатів лабораторної діагностики колибактеріозу, тимчасом як перевага запропонованого способу — швидкість проведення реакції (5–10 хв).

Виявлення генів ST- і LT-ентеротоксинів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) не є показником вірулентності *E. coli*. Тільки індикація продуктів експресії цих генів — об'єктивний доказ етіологічної ролі *E. coli* при колибактеріозі. Розроблений латексний діагностикум на основі антитіл до кон'югату ентеротоксинів саме дозволяє ефективно проводити цю індикацію.

## Висновки

Розроблений високоефективний латексний антитільний діагностикум для прижиттєвої і посмертної індикації ентеротоксигенних *Escherichia coli* при діагностиці колибактеріозу, визначена частота зустрічальності штамів-продуцентів термостабільного і термолабільного ентеротоксинів, а також концентрація токсинів у фекаліях хворих і вмісті кишечнику загиблих телят.

Різниця в кількості позитивних проб діагностикумів на основі антитоксинів у дослідних і контрольних групах була високовірогідною ( $P < 0,05$ ).

Контроль антигену був позитивним у 100 % випадків (титр 1:64), а контроль діагностикума на основі антитіл нормальної сироватки крові биків — негативним.

Перевагою методу є швидкість проведення реакції (5–10 хв), а також можливість тривалого зберігання діагностикума.

Наступний етап роботи передбачає розробку оптимальних алгоритмів застосування латексного діагностикума для поліпшення технологічності, підвищення ефективності та зменшення вартості діагностичних досліджень.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Липин А. В. Диспепсія телят / А. В. Липин // Ветеринарный консультант. — 2002. — № 15. — С. 6–7.

2. 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.

3. Олійник Л. В. Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу / Л. В. Олійник // Ветеринарна медицина : міжвід. тематичний наук. зб. — Х., 2004. — № 83. — С. 167–170.

4. 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. — Vol. 38 (1). — P. 27–31.

5. Пат. 22298 Україна, А61К 39/108. Спосіб біотестування штамів *Escherichia coli*, продукуючих термостабільний (ST) ентеротоксин / Сухарев Ю. С. ; заявл. 02.10.2006; опубл. 25.04.2007, Бюл. № 5. — С. 3.

6. Сухарев Ю. С. Выделение гаптенспецифических антител с помощью иммуносорбента на основе энтеротоксинов *E. coli* / Сухарев Ю. С. // Ветеринарна медицина : міжвід. тематичний наук. зб. — Х., 2007. — Вип. 88. — С. 248–251.

7. Пат. 30128 Україна, А61К 39/108. Спосіб виготовлення гіперімунної антитоксичної сироватки крові до кон'югату термостабільного і термолабільного ентеротоксинів *E. coli* / Сухарев Ю. С. ; заявл. 06.11.2007; опубл. 11.02.2008, Бюл. № 3. — С. 3.

УДК 611.41:611.16:573.7-017.6

О. Л. Холодкова, А. П. Марасич, Н. В. Нескоромна

# МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ БІЛОЇ ПУЛЬПИ СЕЛЕЗІНКИ ТА ЇЇ ГЕМОМІКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА В ОНТОГЕНЕЗІ

Одеський національний медичний університет

Незважаючи на те, що селезінка не належить до життєво важливих органів, її роль в імунній системі людини посідає особливе місце як периферична лімфоїдна морфо-

функціональна одиниця, яка має тісні анатомічні зв'язки з кровоносною системою завдяки продукції та секреції безлічі клітинних медіаторів. У зв'язку з такою функцією в організ-

мі людини саме селезінці належить важлива роль у здійсненні імунного контролю у відношенні антигенів, що можуть потрапити у кров [3]. Така спільність механізмів основних

