УДК 619; 616.98: 579.842.11: 631.147

МЕТОД ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ ЭНТЕРОТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI

Сухарев Ю. С.
Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61077 Украина,
тел.: +38 (066)498-48-11, e-mail: Yuriy_sukharev@mail.ru

Разработан метод идентификации энтеротоксигенных штаммов кишечной палочки с помощью фотометрической индикации их энтеротоксинов в фекалиях животных, больных колибактериозом. Преимуществом метода является быстрота проведения реакции (20–30 минут), а также возможность длительного хранения антитоксических сывороток. Метод рекомендуется использовать для прижизненной диагностики колибактериоза непосредственно в зонах массовых желудочно-кишечных заболеваний животных.

Ключевые слова: *Escherichia coli, энтеротоксины, иммунные комплексы, колибактериоз, фотометрия.*

Актуальность и цель работы

Колибактериоз — наиболее распространенное среди новорожденных животных инфекционное заболевание, вызываемое токсигенными бактериями *Escherichia coli*, — является одной из серьезнейших проблем современной ветеринарной медицины [3, 4, 5]. Колибактериоз не имеет специфических клинических признаков и характеризуется, в основном, только симптомом диареи, обусловленным действием энтеротоксинов (ЭТ): термолабильного (LT) и термостабильного (ST) [6, 9, 10]. Идентификация этих факторов патогенности при экспресс-диагностике сопряжена со значительными трудностями из-за сложности определения токсигенности штаммов *E. coli* [1].

Для идентификации энтеротоксигенных *E. coli* и обнаружения их ЭТ используют разнообразные физико-химические и биологические методы [2, 7]. Но эти технологии не пригодны для экспресс-диагностики колибактериоза: они разработаны в основном для индикации LT-, а не ST-ЭТ; их невозможно применить прижизненно, непосредственно в зонах массовых желудочно-кишечных заболеваний животных; они являются длительными, трудоемкими, дорогостоящими, трудновоспроизводимыми, дефицитными по используемым реагентам, часто неспецифичными, не обладающими достаточной чувствительностью. Наконец, большинство известных методов не соответствует нормам биоэтики.

В связи с этим возникла необходимость в разработке высокоспецифичного экспресс-метода определения энтеротоксигенных *E. coli*, позволяющего идентифицировать возбудителя колибактериоза еще на латентной стадии заболевания, что позволит своевременно проводить профилактические и лечебные мероприятия, а также осуществлять эпидемиологический мониторинг за присутствием и распространением токсигенных штаммов кишечной палочки в окружающей среде.

Целью настоящего исследования была разработка метода идентификации энтеротоксигенных *E. coli* с помощью фотометрической индикации их энтеротоксинов в фекалиях телят, больных колибактериозом.

Материалы и методы

В работе использованы: фосфатно-солевой буфер pH 7,5; лиофилизированные ST и LT-ЭТ; фреон ($C_2Cl_3F_3$) для осветления мутных сывороток; центрифуга; микрокюветы (Sarstedt) для лазерной нефелометрии; гелий-неоновый лазерный нефелометр (Behring Werke, Марбург).

Приготовление иммунизирующего препарата осуществляли следующим образом: 100 мг LT-ЭТ растворяли в 2,0 мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 6,8, который содержал 12,5 г/л глутаральдегида (Reanal, Венгрия).

Через 18 часов экспозиции при комнатной температуре смесь наносили на хроматографическую колонку 0,9×60 см с сефадексом G-25, уравновешенную 0,15 М раствором хлорида натрия.

Фракции, которые содержали активированный LT-ЭТ (экстинкция при 403 нм), объеди-

© Сухарев Ю. С., 2010

няли и концентрировали до 1/10 исходного раствора ПЭГ с молекулярной массой 3000 D. К этому раствору добавляли 50 мг ST-ЭТ, растворенного в смеси 10 мл 0,15 М раствора хлорида натрия и 1,0 мл карбонат-бикарбонатного буфера.

Через 24 часа инкубации при температуре 4°С добавляли 1,0 мл 0,2 М раствора лизина и на 2 часа ставили на диализ против 0,1 М фосфатно-солевого буфера. Конъюгат центрифугировали 20 минут при 2000 g и сохраняли при температуре 4°С.

Конъюгат ЭТ смешивали с равными объемами полного адъюванта Фрейнда или 30 % раствора гидроокиси алюминия; смесь тщательно взбалтывали и выдерживали при комнатной температуре 4 часа, повторяя взбалтывание через каждые полчаса. Готовый иммунизирующий препарат сохраняли в холодильнике при температуре 4°С.

Для получения гипериммунных антитоксических сывороток крови использовали 11 быков Красно-степной породы в возрасте 1,0–1,5 лет из опытного хозяйства «Украинка» Харьковского района, благополучного по инфекционным заболеваниям.

Иммунизацию проводили двукратно с интервалом 30 дней. Конъюгат вводили внутримышечно, в 2–4 точки, в дозе 5,0 и 6,0 мг/мл, в объеме 5 мл. На 7-й день после ревакцинации у каждого животного отбирали по 5 л крови и получали 2,8–3,0 л сыворотки.

Для получения антитоксической сыворотки молозива 6 глубокостельным коровам внутримышечно за 1,5 месяца до ожидаемого отела вводили конъюгат ST/LT-ЭТ с адъювантом (гидроокись алюминия) в дозах 5 и 6 мг, в объеме 5 мл, с интервалом между инъекциями 14 дней. Через 2–3 часа после отела у коров отбирали по 300–500 мл молозива и получали сыворотку по методу Чекишева [8].

В качестве исследуемого материала использовали фекалии больных колибактериозом телят. Фекалии центрифугировали при 5000 g в течение получаса и собирали супернатант. При наличии в исследуемом материале большого количества слизи в него добавляли физиологический раствор, перемешивали, пропускали через ватный фильтр и центрифугировали, как описано выше.

Определение белка в стандартных разведениях ЭТ проводили спектрофотометрически по методу Варбурга и Христиана при длине волны 260 и 280 нм. Концентрацию белка (мг/мл) рассчитывали по формуле Калькара:

$$C_б = 1{,}45\ E_{280} - 0{,}74\ E_{260}.$$

Как известно, инкубация раствора антигена со специфической сывороткой приводит к образованию иммунных агрегатов. Последние способны рассеивать проходящий световой поток, интенсивность которого можно измерить прямо или косвенно с помощью нефелометрического метода. При нефелометрии определяют количество света, отраженного под определенным углом к направлению проходящего светового потока. При этом интенсивность рассеянного света (разность светового потока) прямо пропорциональна числу и величине иммунных комплексов.

В последнее время все более широкое распространение получает лазерная нефелометрия, результаты которой хорошо коррелируют с данными радиальной иммунодиффузии. Точность лазерной нефелометрии очень высока; коэффициент вариации, по данным литературы, колеблется от серии к серии в пределах 4–10 %. Показатели этого метода можно повысить, если автоматизировать анализ.

Особая геометрия лазерного устройства позволяет улавливать свет, рассеянный иммунными комплексами под очень небольшими углами. В современных лазерных нефелометрах достигается полное поглощение света, идущего в прямом направлении, чего не удается достигнуть при использовании обычных источников света ввиду непараллельности их лучей. Высокое постоянство характеристик лазерного излучения позволяет получать хорошо воспроизводимые результаты.

Сущность и новизна разработанного нами метода заключалась в том, что о присутствии ЭТ в исследуемых образцах судили по интенсивности рассеянного света, прямо пропорциональной числу и величине иммунных комплексов, образующихся в результате взаимодействия антигенов с антителами гипериммунных антитоксических сывороток крови и молозива крупного рогатого скота (КРС) к конъюгату ST/LT энтеротоксинов *E. coli.*

На рис. 1. показана схема разработанного устройства для индикации иммунных комплексов.

Результаты и обсуждение

Соблюдая постоянные объемы реагирующих растворов, разведение сыворотки, время и температуру инкубации, определяли концен-

Рис.1. Схема устройства для индикации иммунных комплексов.

трацию антигенов в растворе при помощи калибровочной кривой.

Калибровочную (стандартную) кривую получали, измеряя рассеяние света в растворах с известным содержанием антигена. Для этого использовали геометрический ряд стандартных разведений ЭТ *E. coli* в фосфатно-солевом буфере с pH 7,5 — концентрации от 0,1 до 100 мкг/мл. Кюветы опускали в шахту нефелометра, данные считывали с цифрового табло. Калибровочную кривую строили в системе координат, где по оси ординат откладывали полученные значения единиц светорассеяния (в вольтах), а по оси абсцисс — соответствующие значения концентрации ЭТ.

Гипериммунные антитоксические сыворотки подвергали осветлению с помощью центрифугирования при 1500 g в течение 10 минут с обработкой фреоном: 1 мл сыворотки смешивали с 1,5 мл фреона, перемешивали в горизонтальном направлении, центрифугировали 10 минут при 1000 g. Такая обработка приводила к получению относительно прозрачной сыворотки. Сыворотки разводили в отношении 1:100 (50 мкл сыворотки + 5 мл буфера).

К 100 мкл разведенных сывороток прибавляли 200 мкл супернатанта фекалий телят, больных колибактериозом. Смесь инкубировали в кюветах 20–30 минут при комнатной температуре и проводили измерение. В контроле использовали нормальную сыворотку крови и молозива КРС. Значения светорассеяния иммунных агрегатов переводили в концентрацию с учетом использованных разведений. Полученные значения находились в средней части стандартной кривой (рис. 2 и 3).

Чтобы не допускать снижения точности измерений, необходимо придерживаться следующих условий выполнения лазерной нефелометрии:

1. Измерительные кюветы должны быть тщательно очищены.
2. Кюветы должны быть помечены согласно их ориентации в нефелометре.
3. Из кювет с исследуемыми образцами необходимо удалить пузырьки воздуха.
4. Кюветы следует хранить в отполированном виде.
5. Анализируемый образец необходимо тщательно перемешивать при каждом измерении.
6. Методика подготовки пробы и выполнение измерений должна быть одинаковой.

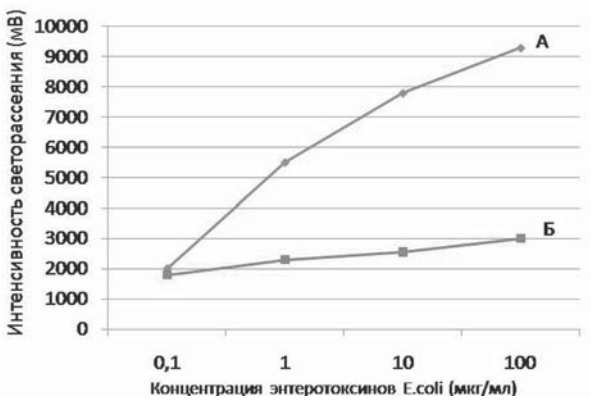

Рис. 2. Зависимость интенсивности светорассеяния (мВ) от концентрации ЭТ *E. coli* (мкг/мл) в фекалиях телят, больных колибактериозом: А — антитоксическая сыворотка крови КРС+ЭТ; Б — нормальная сыворотка крови КРС+ЭТ.

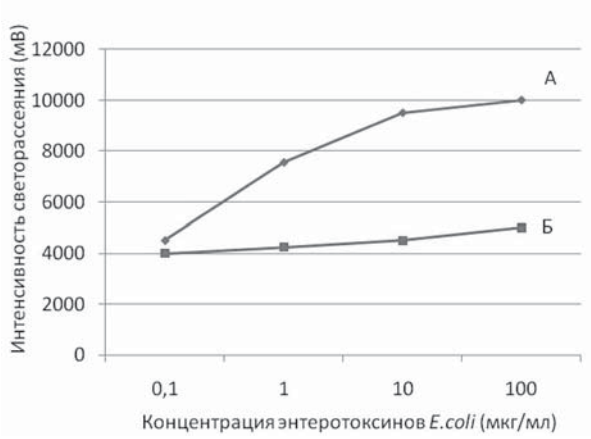

Рис. 3. Зависимость интенсивности светорассеяния (мВ) от концентрации ЭТ *E. coli* (мкг/мл) в фекалиях телят, больных колибактериозом: А — антитоксическая сыворотка молозива КРС+ЭТ; Б — нормальная сыворотка молозива КРС+ЭТ.

7. Температура всех образцов должна быть одинаковой и совпадать с температурой процесса измерения.

В ходе апробации разработанного метода индикации было показано, что гипериммунные антитоксические сыворотки крови и молозива КРС к конъюгату ЭТ *E. coli* образуют иммунные агрегаты с ЭТ, содержащимися в фекалиях телят, больных колибактериозом, что и фиксировалось лазерным нефелометром. При этом контроль нормальной сыворотки крови и молозива с ЭТ был отрицательным.

Интенсивность светорассеяния иммунных комплексов «антитоксическая сыворотка молозива + ЭТ» была выше, чем у комплекса «антитоксическая сыворотка крови + ЭТ» вследствие более высокого уровня антитоксических антител в сыворотке молозива.

Выводы

Фотометрическая индикации ЭТ позволяет проводить экспресс-определение энтеротоксигенных *E. coli* в фекалиях больных животных уже на ранних стадиях заболевания и может быть рекомендована как метод прижизненной диагностики колибактериоза непосредственно в зонах массовых желудочно-кишечных заболеваний.

Преимуществом метода является быстрота проведения реакции (20–30 минут), а также возможность длительного хранения антитоксических сывороток.

Использование антитоксических сывороток к конъюгату ЭТ *E. coli* дает возможность идентифицировать оба энтеротоксина (ST и LT), чего не удается достигнуть с помощью других методов в связи с отсутствием иммуногенных свойств у ST-ЭТ (гаптен).

Разработанный метод является новой, современной технологией диагностики колибактериоза сельскохозяйственных животных, которая может помочь животноводческим предприятиям своевременно предотвращать и устранять это заболевание, создавать стада здорового скота и, следовательно, поставлять на рынок экологически чистые продукты животноводства, а также осуществлять эпидемиологический мониторинг за присутствием и распространением токсигенных штаммов кишечной палочки в окружающей среде.

Литература

1. Алексанкин А. П. Определениетермолабильного энтеротоксина в кормах и фекалиях с помощью иммуноферментной тест-системы // Кролиководство и звероводство. — 2006. — №5. — С.26–27.
2. Виноходов Д. О. Научные основы биотестирования с использованием инфузорий. — Автореферат диссерт…. докт. биол. наук. — СПб., 2007. — 40 с.
3. Горбунов А. П. О причинах заболеваемости новорожденных телят / А. П. Горбунов, З. Н. Морогина, Н. В. Попова // Ветеринарный консультант. — 2003. — №15. — С.9–19.
4. Липин А. В. Диспепсия телят // Ветеринарный консультант. — 2002. — №15. — С.6–7.
5. 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.
6. Олійник Л.В. Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. — Харків, 2004. — №83. — С.167–170.
7. Сухарев Ю. С. Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе). — Харьков: Коллегиум, 2009. — 92 с.
8. Чекишев В. М. Способ идентификации специфических антигенов в сложных биологических смесях/В. М. Чекишев, Г. А. Бремеева // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки (Новосибирск). — 1991. — №1. — С.86–89.
9. Thielman N. M. Acute infectious diarrhea / N. M. Thielman, R. L. Guerrant // New Engl. J. Med. — 2004. — Vol.350 (1). — P.38–47.

10. Pearson H. The dark side of E. coli // Nature.- PMID 17203031. — 2007. — Vol.445 (7123) — P.8–9.

МЕТОД ФОТОМЕТРИЧНОЇ ІНДИКАЦІЇ ЕНТЕРОТОКСИГЕННИХ ШТАМІВ ESCHERICHIA COLI

.Сухарєв Ю.С
Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна,

Розроблений метод ідентифікації ентеротоксигенних штамів Escherichia coli за допомогою фотометричної індикації їх ентеротоксинів у фекаліях тварин, хворих на колібактеріоз. Перевагою методу є прудкість проведення реакції (20–30 хвилин), а також можливість тривалого зберігання антитоксичних сироваток. Рекомендується використання методу для прижиттєвої діагностики колібактеріозу безпосередньо в зонах масових шлунково-кишкових захворювань тварин.

***Ключові слова**: Escherichia coli, ентеротоксини, імунні комплекси, колібактеріоз, фотометрия.*

A METHOD OF PHOTOMETRIC INDICATION ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI STRAINS

Sukharev Yu.S.
Kharkov National University named after V.N.Karazin,

The method of authentication of enterotoxigenic Escherichia coli strains by the photometric indication of their enterotoxins in faeces of animals with colibacteriosis are developed. Advantage of method is a quickness of leadthrough of reaction (20-30 minutes), and also possibility of the protracted storage of antitoxic wheys. The use of method is recommended for during life diagnostics of colibacteriosis directly in the areas of animals mass gastroenteric diseases.

***Keywords**: Escherichia coli, enterotoxins, immune complexes, colibacteriosis, photometry.*