

УДК 619+616.98:579.842.11+631.147

Ю. С. Сухарев

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ЭНТЕРОТОКСИНА *ESCHERICHIA COLI* ПРИ КОЛИБАКТЕРИОЗЕ ТЕЛЯТ

Разработана ИФА тест-система, с помощью которой идентифицирован термостабильный ST-энтеротоксин *Escherichia coli* в фекалиях телят на разных стадиях заболевания колибактериозом. Диапазон его титра на сверхострой стадии составил ≥ 250 нг/мл, на острой стадии – ≥ 500 нг/мл, а на подострой – $\geq 1\ 000$ нг/мл. Регистрируемые титры энтеротоксина можно считать диагностическими.

Ю. С. Сухарев

Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТЕРМОСТАБІЛЬНОГО ЕНТЕРОТОКСИНУ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ КОЛІБАКТЕРІОЗІ ТЕЛЯТ

Розроблено ІФА тест-систему, за допомогою якої ідентифіковано термостабільний ST-ентеротоксин *Escherichia coli* у фекаліях телят на різних стадіях захворювання колибактеріозом. Діапазон його титру на надгострій стадії склав ≥ 250 нг/мл, на гострій стадії – ≥ 500 нг/мл, а на підгострій – $\geq 1\ 000$ нг/мл. Реєстровані титри ентеротоксину можна вважати діагностичними.

Y. S. Sukharev

V. N. Karazin Kharkiv National University

IDENTIFICATION OF THE THERMOSTABLE ENTEROTOXIN OF *ESCHERICHIA COLI* IN CALVES WITH COLIBACTERIOSIS

IFA test-system is developed for identification of the heat stable (ST) enterotoxin of *Escherichia coli* in the calves faeces at different stages of colibacteriosis. The range of its titre makes ≥ 250 ng/ml at the hyperacute stage, at the acute stage – ≥ 500 ng/ml, and at the subacute one – $\geq 1\ 000$ ng/ml. The registered enterotoxin titres can be considered as the diagnostic indices.

Введение

Несмотря на широкое использование самых современных антибиотиков и био-препаратов, колибактериоз, который вызывают токсигенные *Escherichia coli*, занимает лидирующее положение по количеству случаев заболеваемости и смертности среди других инфекционных патологий у сельскохозяйственных животных [5; 7; 11].

Основная группа факторов, определяющих развитие диарейного синдрома при колибактериозе, включает энтеротоксины: термостабильный (ST) и термолабильный (LT), которые путем активизации аденилат- и гуанилатциклазы нарушают транспорт электролитов и воды через мембраны клеток кишечного эпителия. В результате этого данные вещества переходят в просвет тонкого кишечника, что приводит к развитию водянистой диареи и дегидратации организма [13; 14]. Колибактериоз проявляется

главным образом в первые три дня жизни телят. Иногда они заболевают сразу после рождения, еще до приема молозива, и в течение 12–48 часов болезнь оканчивается летальным исходом [12].

Имеющаяся современная классификация колибактериоза основана на учете времени течения болезни. В связи с этим по клиническим проявлениям различают сверхострую, острую и подострую формы [2; 6].

Сверхострое течение болезни встречается в основном у телят первых 3–5 дней жизни и характеризуется диареей высокой интенсивности. Истощенные животные погибают в глубоком коматозном состоянии.

Остро болезнь протекает у телят в возрасте 3–7 дней. Болезнь длится несколько суток и заканчивается летальным исходом.

Если животное перенесло острый приступ болезни, наступает постепенное выздоровление. Заболевание переходит в подострое. Подострая форма бывает также при заболевании телят в возрасте 6–10 дней и является следствием затяжного острого течения болезни.

Применяющиеся в настоящее время фенотипические методы определения токсигенности *E. coli* с технической точки зрения сложны и часто недостаточно чувствительны. Более того, они занимают не менее 18–24 часов после выделения колоний кишечной палочки до получения окончательного результата. Это обстоятельство не удовлетворяет ни клиницистов, ни эпидемиологов [3].

Известные методы определения энтеротоксигенных *E. coli* с помощью ИФА дают возможность идентифицировать только LT-энтеротоксин *E. coli* в исследуемых образцах [4]. Отсутствие иммуногенных свойств у ST-энтеротоксина не позволяет получить специфические антитела и сконструировать ИФА тест-систему для его обнаружения. На основе собственных исследований и данных литературы установлено, что энтеротоксигенные *E. coli* – возбудители колибактериоза новорожденных телят синтезируют чаще термостабильный ST-энтеротоксин [1; 8].

В связи с этим поставлена цель: определить с помощью ИФА [9] наличие ST-энтеротоксина *E. coli* и его титр в фекалиях телят при сверхостром, остром и подостром течении болезни. Новизна разработанного метода ИФА заключалась в том, что определение энтеротоксинов в фекалиях телят на разных стадиях заболевания колибактериозом осуществляли с помощью антител к конъюгату энтеротоксинов [10], обладающих аффинностью как к LT, так и к ST-энтеротоксинам *E. coli*.

Материал и методы исследований

В состав разработанной ИФА тест-системы входили следующие компоненты: полистироловый 96-луночный планшет; кроличьи поликлональные биспецифические антитела к конъюгату энтеротоксинов *E. coli*; калибровочный материал – лиофилизированный ST-энтеротоксин; конъюгат мышинных антикроличьих антител с пероксидазой хрена, полученный перийодатным методом Nakane и Kawaoi; фосфатно-солевой буфер с *pH* 7,2–7,4; карбонатный буфер с *pH* 9,6; цитратный буфер; твин-20 (детергент); индикаторная субстратная смесь: кислота лимонная, натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, ортофенилендиамин, перекись водорода; серная кислота.

У телят с клиническим проявлением сверхострой, острой и подострой формой колибактериоза брали пробы фекалий в количестве 10 г в стерильную посуду стерильным инструментом. При этом срок доставки материала в лабораторию с момента его забора не превышал 2 часов. При невозможности доставки материала в указанный срок его хранили в холодильнике при 4 °С не более 6 часов. Фекалии центрифугировали

при 2 000–3 000 об./мин. в течение получаса, осадок отбрасывали, а супернатант собирали в отдельные пробирки и использовали для ИФА.

Чувствительность тест-системы вычисляли по формуле Р. А. Тигранян:

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

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

Результаты и их обсуждение

В основу разработанного метода определения энтеротоксинов *E. coli* положен метод двойных антител (“сэндвич-ИФА”). Этот тест представляет собой метод неконкурентного твердофазного ИФА для индикации энтеротоксинов *E. coli*, в котором твердая фаза покрыта высокоаффинными биспецифическими антитоксинами. Амплификация достигалась с использованием технологии полимерной конъюгации, в результате чего происходила фиксация, при которой на каждый связанный участок антигена приходился полимерный комплекс с высокомолекулярным фрагментом (рис. 1).

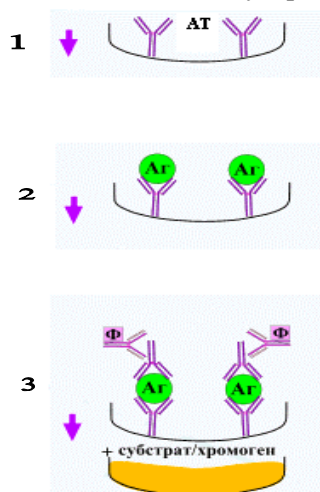


Рис. 1. Схема “сэндвич-ИФА” (метод двойных антител):

- 1 – АТ, связанные с твердой фазой; 2 – инкубация с пробой, содержащей энтеротоксины;
3 – инкубация с субстратом и измерение количества продукта реакции

Сенсибилизацию 96-луночного полистиролового планшета проводили внесением в каждую лунку 0,1 мл кроличьих специфических антитоксических антител к ST-энтеротоксину *E. coli*. Планшет накрывали крышкой и помещали на три часа в термостат при +37 °С. Извлекали содержимое лунок встряхиванием, промывали дважды раствором фосфатного буфера с твином-20, рН 7,3 и четыре раза – раствором фосфатно-солевого буфера, но без твина.

Готовили 8 двойных разведений ST в фосфатно-солевом буфере так, чтобы получить интервал концентраций от 1 000 до 0,08 нг/мл. Лунки А₁–Н₁ полистиролового планшета использовали в качестве контроля, внося в них все компоненты, кроме стандартов ST-энтеротоксина. Анализируемые образцы фекалий вносили по 0,1 мл в две

лунки планшета и инкубировали 30 минут при +37 °С, затем промывали карбонатным буферным раствором с *pH* 9,6.

Во все лунки планшета добавляли по 0,1 мл раствора, содержащего конъюгат мышинных антикроличьих антител с пероксидазой хрена. Планшеты инкубировали в течение 30 минут при +37 °С и промывали дважды раствором фосфатно-солевого буфера с *pH* 7,3, который содержал твин-20, и четыре раза – раствором того же буфера, но без твина.

В лунки вносили по 0,1 мл раствора, содержащего индикаторную субстратную смесь, и инкубировали в течение 15–20 минут при +20 °С. Визуально позитивные пробы окрашивались в желто-оранжевый цвет. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству ST-энтеротоксина в исследуемых образцах. Для остановки реакции использовали 0,1 мл раствора серной кислоты (2 моль/л), который добавляли во все лунки планшета.

Учет результатов проводили инструментально на регистрирующем спектрофотометре «Мультискан» при 492 нм. При этом определяли содержание энтеротоксинов в пробах, которое соответствовало конечному разведению стандарта токсина в лунках, где оптическая плотность пробы и стандарта в два раза превышала поглощение в контроле, но при значениях оптической плотности не менее чем 0,1. Концентрацию энтеротоксина в исследуемых образцах определяли по значению оптической плотности лунки, в которую вносился образец.

Калибровочную кривую зависимости оптической плотности от средней концентрации энтеротоксина (в двух лунках) строили в системе координат, где в выбранном масштабе по оси ординат откладывали полученные значения единиц оптической плотности (ЕОП), а по оси абсцисс – соответствующие значения концентрации энтеротоксина (рис. 2).

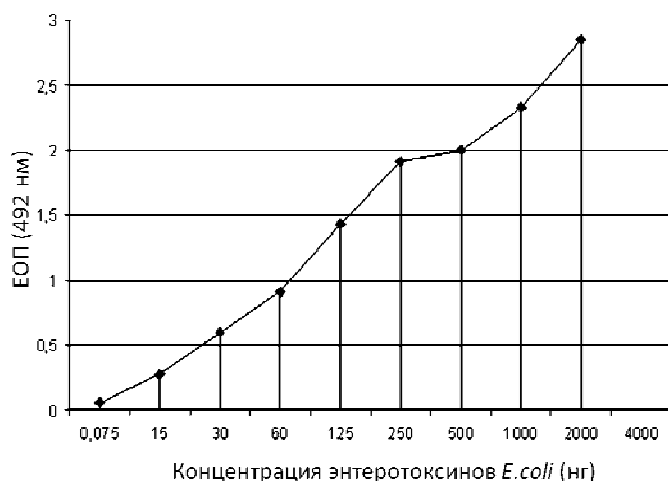


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения концентрации энтеротоксинов *E. coli*

На разных стадиях заболевания колибактериозом в фекалиях телят обнаруживаются энтеротоксины *E. coli* (табл. 1). Специфичность ИФА тест-системы (способность определять только то вещество, для определения которого эта система разработана) подтверждена путем постановки ИФА с бесклеточным супернатантом *P. vulgaris* и стерильной средой культивирования токсигенных штаммов *E. coli* (табл. 2).

Таблица 1

Титр ST-энтеротоксина (нг/мл) в фекалиях новорожденных телят при сверхостром, остром и подостром течении колибактериоза, определяемый ИФА тест-системой

Исследуемый материал	Стадия заболевания	Титр ST, нг/мл
Фекалии	подострая	≥ 1000
	острая	≥ 500
	сверхострая	≥ 250

Таблица 2

Оптическая плотность (ЕОП) бесклеточного супернатанта *P.vulgaris* и стерильной среды культивирования токсигенных штаммов *E.coli* при 492 нм

Исследуемый материал	Результат реакции	ЕОП (492 нм), $X \pm s, n = 4$
Культуральный фильтрат <i>P. vulgaris</i>	–	0,055 ± 0,001
Стерильная среда культивирования <i>E. coli</i>	–	0,070 ± 0,001
Положительный контроль (ST – 125 нг)	+	1,43 ± 0,01

Примечания: «–» – отрицательная реакция, «+» – положительная реакция.

Для штаммов *E. coli*, синтезирующих энтеротоксины, чувствительность разработанной тест-системы составила ~ 6 нг/мл.

Выводы

Разработана ИФА тест-система, с помощью которой идентифицирован термостабильный ST-энтеротоксин *Escherichia coli* в фекалиях телят, находящихся на разных стадиях заболевания колибактериозом. При определении стадии заболевания регистрируемые в ИФА титры энтеротоксинов *E. coli* можно считать диагностическими.

Индикация энтеротоксинов *E. coli* с помощью твердофазного ИФА является экономным и в то же время достаточно специфичным и чувствительным методом в рутинной диагностике колибактериоза. В связи с этим ИФА может применяться для получения окончательного результата определения токсигенности штаммов *E. coli* в течение рабочего дня. Преимуществом разработанного теста является отсутствие ложноположительных результатов, обусловленных межвидовой перекрестной реакцией ST и LT-энтеротоксинов, отсутствие инфицированного антигенного материала, химически точная структура антигена, а также пригодность для использования на автоматических системах для ИФА.

Библиографические ссылки

1. **Вергнев Ю. В.** Бактериальные токсины: биологическая сущность и происхождение // Журн. микробиол. – 1996. – № 3. – С. 43–46.
2. **Захаров П. Г.** Профилактика и лечение болезней новорожденных телят // Зооиндустрия. – 2001. – № 3. – С. 21–25.
3. **Иванов А. С.** Современные подходы к микробиологической диагностике и терапии инфекционных диарей // Болезни органов пищеварения. – 2004. – № 2. – С. 15–17.
4. **Имуноферментная** тест-система для определения термолабильного энтеротоксина эшерихий / А. П. Алексанкин, К. Ш. Матевосян, О. С. Белоновская, С. Н. Серебряков // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии. – М. : ФГОУ ВПО МГАВМиБ им К. И. Скрябина, 2004–2005. – С. 53–56.
5. **Кашин А. С.** Колибактериоз телят в современных экологических условиях Сибири (Особенности эпизоотологии, клин. проявления, патогенез, диагностика, меры профилактики и борьбы). Метод. рекомендации / А. С. Кашин, М. И. Заздравных, Н. А. Шкиль. – Барнаул: Азбука, 2003. – 79 с.

6. **Малов В. А.** Острые инфекционные диарейные заболевания / В. А. Малов, А. Н. Горобченко // Лечащий врач. – 2005. – № 2. – С. 6–8.
7. **Олійник Л. В.** Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу // Ветеринарна медицина. – Х., 2004. – № 83. – С. 167–170.
8. **Сухарев Ю. С.** Визначення термостабільного (ST) ентеротоксину *E. coli* методом твердофазного імуноферментного аналізу // Актуальні проблеми молекулярної діагностики у ветеринарній медицині та біології. Наук.-практ. конф. з міжнар. участю (22–25 травня 2007 р., АР Крим, м. Феодосія) // Ветеринарна медицина. – Х., 2007. – Т. 88. – С. 251–255.
9. **Сухарев Ю. С.** Спосіб виготовлення гіперімунної антитоксичної сироватки крові до кон'югату термостабільного і термолабільного ентеротоксинів *E. coli*. Пат. 30128 Україна, АБ1К 39/108. Заявл. 06.11.2007; опубл. 11.02.2008. Бюл. № 3. – С. 3.
10. **Сухарев Ю. С.** Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе). – Х. : Коллегиум, 2009. – 92 с.
11. **Шахов А. Г.** Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят // Ветеринарный консультант. – 2003. – № 1. – С. 4–5.
12. **Шпонько Ю. Б.** Этиологические факторы, профилактика и терапия диарей телят и поросят в Краснодарском крае: Автореф. дисс. ... канд. вет. наук: 16.00.01, 16.00.03. – Воронеж, 2007. – С. 12–13.
13. **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. – Vol. 38, N 1. – P. 27–31.
14. **Thielman N. M.** Acute infectious diarrhea / N. M. Thielman, R. L. Guerrant // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 350 (1). – P. 38–47.

Надійшла до редколегії 17.01.2011