

**ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЛЕСІ УКРАЇНКИ**

**ВИГОТОВЛЕННЯ ДІАГНОСТИКУМУ ДЛЯ
ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ ІНДИКАЦІЇ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ
ЕНТЕРОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ *ESCHERICHIA COLI***

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Луцьк - 2025

Методичні рекомендації
розглянуті і схвалені науково-методичною радою
Волинського національного університету
імені Лесі Українки
(протокол № 4 від 17.12.2025 р.)

Автори: Бойко П.К., доктор ветеринарних наук
Бойко О.П., кандидат ветеринарних наук,
Панівська О.В., доктор філософії
Поручинський Б.А., аспірант

Виготовлення діагностикуму для імунофлуоресцентної індикації та ідентифікації ентеропатогенних штамів *E. coli*:
Методичні рекомендації для спеціалістів ветеринарної медицини, науковців та студентів / П.К. Бойко, О.П. Бойко, О. В. Панівська, Б.А. Поручинський /. Луцьк: ВНУ, 2025. 20 с.

У методичних рекомендаціях детально описано регламентні етапи технологічного процесу отримання та використання високоактивних видоспецифічних імунофлуоресцентних ешерихіозних глобулінів. Зокрема, подано процедури відбору виробничо-контрольного штаму *E. coli*, приготування з нього вакцинного препарату, схеми імунізації тварин-донорів з метою одержання високоактивних ешерихіозних сироваток, а також методика виділення, мічення флуорохромом (ізотіоціанат флуоресцеїну) та очищення глобулінів. Отримані препарати призначені для використання як діагностикум для імунофлуоресцентної індикації та ідентифікації ентеропатогенних штамів *E. coli* у лабораторній діагностиці ешерихіозів тварин і людини.

Рецензенти:

кандидат біологічних наук **В.П. Войтюк**
кандидат біологічних наук **О.П. Мотузюк**

ЗМІСТ

№	Назва розділу	Стр
1.	ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ	4
2.	ВИГОТОВЛЕННЯ ВИДОСПЕЦИФІЧНИХ ГЛОБУЛІНІВ ПРОТИ ЕНТЕРОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ <i>E. COLI</i>	7
2.1.	Підбір виробничо-контрольного штаму для виготовлення антигенів і порядок роботи з ними	7
2.2.	Виготовлення антигену для імунізації тварин-донорів	8
2.3.	Імунізація тварин-донорів і отримання сироваток проти ентеропатогенних штамів <i>E. coli</i>	10
2.4.	Контроль якості сироватки	11
2.5.	Одержання видоспецифічних сироваток проти ентеропатогенних штамів <i>E. coli</i>	11
2.6.	Приготування розчину глобулінів проти ентеропатогенних штамів <i>E. coli</i>	12
2.7.	Виготовлення флуоресціюючих глобулінів проти ентеропатогенних штамів <i>E. coli</i>	15
2.8.	Контроль якості та умови зберігання мічених глобулінів	17
3.	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	19

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Escherichia coli (*E. coli*) – грамнегативна бактерія, найпоширеніший коменсал кишечника людини й теплокровних тварин та водночас один із ключових бактеріальних патогенів, що є частою причиною різних діарейних інфекцій, зокрема діареї мандрівників і дизентерії [1, 2, 3]. Вона також є головним збудником неускладнених інфекцій сечового міхура та може спричиняти інші позакишкові патології, такі як пневмонія, бактеріємія та внутрішньочеревні інфекції, включно зі спонтанним бактеріальним перитонітом [2]. Хвороби, пов'язані з *E. coli*, мають суттєвий вплив на здоров'я пацієнтів і створюють значне навантаження на систему охорони здоров'я, тому важливими є рання діагностика та своєчасна терапія.

Патогенні *E. coli* залишаються провідною причиною гострих кишкових інфекцій (ГКІ) у світі, особливо у дітей віком до 5 років у країнах, що розвиваються. Вони спричиняють до 15% усіх випадків ГКІ [1].

За даними Н.Г. Малиша та М.Д. Чемича (2014), діреєгенні ешерихіози відносяться до порівняно малопоширених інфекційних захворювань в Україні. Показники інцидентності у 2003–2013 рр. коливалися у межах від 1,7 до 5,4 на 100 тис. населення. При цьому спостерігалась тенденція до зростання впродовж вказаного періоду. Слід зазначити, що найбільш вразливою віковою групою були діти до 1 року. Виявлено кореляцію між частотою знаходження молока та молочних продуктів, що не відповідають санітарно-бактеріологічним нормам, і рівнем захворюваності на ешерихіози, що спричинені ентероінвазивними штамами *E. coli* [3].

Кишкова паличка здатна виживати у різних середовищах (стічні води, ґрунт, рослини, недостатньо термічно оброблене м'ясо, непастеризоване молоко). Високий ризик інфікування патогеном пов'язаний з тим, що він має досить широкий спектр господарів. Відомо, що виявлення кишкової палички у поверхневих водоймах та

харчових продуктах свідчить про фекальне забруднення цього середовища [5]. Резистентні штами *E. coli* поширюються від тварин до об'єктів навколишнього середовища через харчові продукти тваринного походження, біологічні рідини, гній та стічні води, а звідти – до людей через харчовий ланцюг або прямий контакт (фекально-оральний шлях передачі).

Значне поширення кишкової палички наносить економічні збитки тваринницьким господарствам [4].

Ентерогеморагічні штами *E. coli* або шига-токсигенні штами Шига-токсигенна *E. coli* часто колонізують кишечник великої рогатої худоби та інших тварин, не спричиняючи в них хвороби, оскільки вони позбавлені рецепторів до токсинів *E. coli*. У людей, особливо дітей, літніх та ослаблених імунітетом, вона може викликати тяжкі інфекції. Зараження відбувається через прямий контакт із тваринами чи хворими, воду, але найчастіше – через забруднені харчові продукти, зокрема яловичий фарш, овочі та салати [4]. Завдяки заходам безпеки рівень зараження цим патогеном за останні десятиліття знизився. Проте ризик передачі збудника від тварин до рослин залишається, тому важливо зменшувати фекальне забруднення патогеном об'єктів довкілля саме на рівні ведення тваринництва і виробництва тваринницької продукції [6].

Завдяки простоті культивування, розшифрованому геному та здатності рости в аеробних і анаеробних умовах *E. coli* є важливим інструментом у біотехнології та найчастіше використовується у технологіях із рекомбінантною ДНК. Залежно від наявності факторів вірулентності та клінічних проявів хвороби штами *E. coli* поділяють на кілька патотипів, зокрема 7 кишкових (EPEC) та 3 позакишкові (ExPEC) [1].

Бактерії є одними з найпростіших одноклітинних організмів, проте вони демонструють значну гетерогенність у своїй фізіології та поведінці. Ця гетерогенність, що виникає з генетичних, екологічних або стохастичних факторів, критично впливає на те, як бактерії адаптуються до навколишнього середовища та взаємодіють з ним. Розуміння бактеріальної гетерогенності є основоположним завданням

у мікробіології, оскільки вона відіграє вирішальну роль у виживанні та адаптивності бактерій в різних середовищах. Для дослідження бактеріальної гетерогенності широко використовуються методи оптичної мікроскопії [7]. Методи візуалізації з високою роздільною здатністю можуть бути використані для ідентифікації бактерій та вивчення їхніх фізіологічних властивостей, таких як: локомоторна активність, формування біоплівки та клітинна реакція. Антитіла, мічені флуорохромами, можуть надавати інформацію про субклітинні структури або відображати метаболічний стан клітини [8].

Метод імуофлуоресцентної мікроскопії поєднує в собі точність світлової мікроскопії з високою специфічністю імунологічних реакцій. Його головні переваги – висока чутливість (дозволяє виявляти мікроорганізм у змішаній культурі навіть за концентрації близько 100 клітин у 1 см³) та швидка індикація й ідентифікація збудника в досліджуваному матеріалі, що може тривати всього близько години від моменту отримання зразка [8]. Завдяки цьому метод флуоресціюючих антитіл вважають експрес-методом лабораторної діагностики бактеріальних інфекцій.

Методичні рекомендації призначені для навчально-наукових мікробіологічних лабораторій вищих учбових закладів медичного профілю, діагностичних лабораторій клінічних лікарень і Держпродспоживслужби та науково-дослідних установ, де розробляють лікувально-профілактичні і діагностичні препарати для діагностики, лікування та профілактики заразних захворювань людини і тварин.

Методичні рекомендації можуть бути використані в учбовому процесі при викладанні загальної мікробіології, медичної мікробіології, вірусології та імунології.

2. ВИГОТОВЛЕННЯ ВИДОСПЕЦИФІЧНИХ ГЛОБУЛІНІВ ПРОТИ ЕНТЕРОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ *E. COLI*

2.1. Підбір виробничо-контрольного штаму для виготовлення антигенів і порядок роботи з ними

2.1.1. Як виробничо-контрольний штам для виготовлення антигенів може бути використаний будь-який ентеропатогенний штам *E. coli*, попередньо ідентифікований за тинкторіально-морфологічними, культурально-біохімічними, антигенними та біологічними властивостями та перевірений на відсутність явищ самоаглютинації й термоаглютинації.

Морфологічні ознаки, тинкторіальні, культурально-біохімічні та патогенні властивості штаму *E. coli*, який підбирають для використання в подальшому як виробничо-контрольний, оцінюють відповідно до діючих протоколів (стандартів) лабораторного дослідження біологічного матеріалу на ешерихіоз [7].

Виробничо-контрольний штам *E. coli* має відповідати таким критеріям: це грамнегативні, дрібні, прямі або злегка зігнуті палички із заокругленими кінцями, що розташовуються переважно поодинокі або парами, не утворюють спор чи капсул. Після 18–24 год. культивування на МПБ при 37°C штам повинен спричиняти виражене помутніння середовища з утворенням осаду на дні. На щільних поживних середовищах (МПА) через 24 год інкубації мікроорганізм формує випуклі напівпрозорі колонії сіруватого кольору з перламутровим відтінком, гладкою поверхнею, чітко окресленими або злегка зрізаними краями та помірно підвищеною центральною ділянкою; показує позитивні результати для тестів на каталазу, бета-галактозидазу, утворення індолу, лізин-декарбоксилази, тесту з метиловим червоним, відновлення нітратів, утворення кислоти з: L-арабінози, лактози, D-манітолу, D-манози, D-сорбіту, трегалози та D-ксилози; та негативні результати для ДНК-ази, утворення H₂S, оксидази, уреазі, реакції Фогеса-Проскауера, ліпази, желатинази,

використання цитрату, фенілаланіну та утворення кислоти з: адонітолу, D-арабітолу, целобіози, α -метил-D-глюкозиду, інозитолу та еритритолу; у β -гемолітичних штамів – гемолізину (на 10 %-му кров'яному агарі утворювати навколо колоній зони β -гемолізу до 10 мм, або повний гемоліз), спричиняти загибель білих мишей масою 14–16 г у межах 24–120 год. після інтраперитонеального введення $0,5 \text{ см}^3$ 18-годинної бульйонної культури з концентрацією 500 млн. мікробних тіл в 1 см^3 .

2.1.2. Самоаглютинацію перевіряють за наступною процедурою: суспензію мікробних клітин робочого штаму з концентрацією 1×10^9 КУО/см³, попередньо тричі відмитих у 0,85% розчині хлориду натрію, інкубують при 37°C протягом 24 год. Відсутність аглютинації клітинної маси після витримування свідчить про відсутність у культури здатності до самоаглютинації.

2.1.3. Відсутність термоаглютинації оцінюють шляхом прогрівання суспензії мікробних клітин досліджуваного штаму (1×10^9 КУО/см³, тричі відмитих) на киплячій водяній бані протягом 1 год. Після термообробки результати аналізують через 30 хв, 1 год та 24 год відстоювання при кімнатній температурі. Відсутність утворення аглютинату протягом зазначених інтервалів часу свідчить про відсутність термоаглютинабельності культури.

2.1.4. Штами зберігають у напіврідкому МПА під вазеліновою олією при +2 – +8°C протягом 3 міс., або у кріопробірках у спеціальному середовищі за -70°C протягом року. Робочу культуру зберігають при +2 – +8°C на МПА протягом 7 діб.

2.2. Виготовлення комплексного ОН-антигену із виробничо-контрольного штаму *E. coli* для імунізації тварин-донорів

2.2.1. ОН-антиген для імунізації тварин-донорів готують із мікробних клітин *E. coli*. Бактеріальну масу накопичують шляхом культивування на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) або м'ясо-пептонному агарі (МПА) за аеробних умов.

2.2.2. Для цього з середовища зберігання бактеріологічною петлею відбирають типову колонію робочого штаму *E. coli* та

висівають її у МПБ (по 5 см³ у пробірці) або на МПА (по 15 мл у чашці Петрі). Посіви інкубують при 37 °С.

2.2.3. МПБ через 4–5 год інкубації, після появи рівномірного помутніння або формування типових для *E. coli* колоній на МПА (див. п. 2.1.1), а також підтвердження чистоти та специфічності культури *E. coli* у препаратах «висяча крапля» чи «роздушена крапля»: активно рухливі дрібні палички з заокругленими кінцями, без спор і капсул; та при мікроскопії мазків за Грамом: грамнегативні поліморфні палички, розташовані поодинокі або попарно; культуру пересівають у літрові флакони з МПБ по 500 см³. Вміст флаконів обережно перемішують обертальними рухами та інкубують при 37 °С протягом 12–16 год..

2.2.4. Після закінчення терміну інкубації здійснюють мікроскопію на специфічність отриманої культури та чистоту (п. 2.2.3). У випадку підтвердження чистоти росту до культури додають 7 см³ 37 % розчин нейтрального формаліну з таким розрахунком, щоб кінцева концентрація формальдегіду становила 0,5±0,1%. Отриманий розчин перемішують коловими рухами; після цього знову поміщають у термостат та повторюють процедуру помішування через кожні 2 год.

2.2.5. Формалінізацію бульйонної культури здійснюють впродовж 6–8 год. Тоді культуру відстоюють у термостаті протягом 24 год., надосадову рідину зливають, а осад мікробних клітин центрифугують при 4000 об/хв протягом 20 хв. Надосадову рідину декантують, а осад суспендують у стерильному 0,85% розчині натрію хлориду. Осад ще раз центрифугують і суспендують у 0,85 % розчині натрію хлориду, доводячи концентрацію до 3±0,2 млрд/см³. Перевірку концентрації здійснюють за допомогою фотоколориметра, денситометра чи оптичного стандарту каламутності. Отриманий у такий спосіб антиген перевіряють на стерильність та нешкідливість. Зберігають антиген за 0–4 °С.

2.2.7. Контроль стерильності. Готовий антиген у кількості по 0,5 см³ висівають на 2 пробірки з МПБ та. Посіви інкубують за +37 °С

протягом 48 год. Відсутність росту у всіх пробірках свідчить про стерильність виготовленого антигену.

2.2.8. Контроль безпечності (нешкідливості). Використовують 2 білих мишей масою 16 г. Антиген (концентрація 500 млн м.т./см³) вводять підшкірно в дозі 0,5 см³. Якщо досліджувані тварини не загинули та не захворіли впродовж п'яти діб, то антигенний препарат вважають безпечним (нешкідливим).

2.3. Імунізація тварин-донорів і отримання імунних ешерихіозних сироваток

2.3.1. Як тварин-донорів використовують клінічно здорових кролів, баранів, бугаїв та коней.

2.3.2. Імунізація тварин здійснюється за схемами, які включають триразове внутрішньовенне або внутрішньом'язове введення антигену з інтервалом у три дні. Дози, що вводяться, для кожного виду тварин різні: для бугаїв і коней – 10, 20 та 40 мільярдів мікробних тіл; для баранів – 5, 10 та 20 мільярдів; для кролів – 1, 2 та 5 мільярдів мікробних тіл. Такий підхід забезпечує поступове формування імунної відповіді у відповідності з біологічними особливостями кожного виду.

2.3.3. Забір крові у бугаїв, коней і баранів проводиться через 18–21 добу після останнього введення антигену. Кров від коней і бугаїв беруть з яремної вени в обсягах 300±50 см³ і 150±50 см³ відповідно. У кролів кров збирають шляхом тотального знекровлення у стерильні ємності, заздалегідь змочені 0,85% розчином натрію хлориду. Отриману кров витримують за 37 °С протягом однієї години, після чого обводять згусток, а ємності з кров'ю для повнішого відходу сироватки зберігають за 2–4 °С протягом 12–24 год. Сироватку, що відділяється, зливають у стерильний посуд і зберігають при температурі 0–4 °С для збереження її біологічної активності або фасують у стерильні пластикові ємності і заморожують.

2.4. Контроль якості сироватки

2.4.1. Отримані сироватки, специфічні до ОН-антигенів ентеропатогенних штамів *E. coli*, оцінюють за їхньою активністю та специфічністю за допомогою реакцій аглютинації.

2.4.2. Реакцію аглютинації проводить в об'ємі 1 см³ в полістиролових планшетах, куди по лунках вносять по 0,5 см³ послідовних двократних розведень сироватки, починаючи з розведення 1:5, після чого додають 0,5 см³ антигену. Як антиген для визначення активності сироватки використовують 2-мільярдну суспензію мікробних тіл антигену, який застосовувався для імунізації донорських тварин.

Для оцінки специфічності застосовують 2-мільярдні суспензії формалінізованих та двократно відмитих мікробних клітин 14–16-годинних культур інших штамів *Escherichia coli*, а також культур гетерологічних видів бактерій таких як *Salmonella enteritidis*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Після змішування компонентів вміст планшетів ретельно перемішують круговими рухами, після чого інкубують за 37°C протягом 4 год., а далі 18–20 год. за кімнатної температури. Оцінка результатів реакції аглютинації здійснюється за загальноприйнятою шкалою з використанням системи оцінки в плюсах, при цьому реакцію вважають позитивною, якщо вона досягає або перевищує рівень у два плюси.

2.4.3. Сироватки вважають активними, якщо вони демонструють позитивну реакцію з антигенами мікробів гомологічних штамів *E. coli* у розведенні 1:640 і вище у реакції аглютинації.

2.5. Одержання видоспецифічних сироваток проти *E. coli*

2.5.1. Для забезпечення високої видоспецифічності сироваток проти *Escherichia coli* використовують процедуру адсорбції їх суспензіями мікробних клітин гетерологічних видів бактерій. Вибір таких мікробів ґрунтується на їх здатності викликати позитивну реакцію аглютинації у розведенні 1:20 і вище.

2.5.2. Для адсорбування готують суспензії із формалінізованих клітин мікробів-адсорбентів, культивованих на відповідних накопичувальних середовищах згідно з пунктами 2.2.2–2.2.6. Зібрану вегетативну масу тричі промивають стерильним 0,85% розчином натрію хлориду, після чого концентрацію клітин у суспензії доводять до 50 ± 5 млрд./см³.

2.5.3. Імунну ешерихіозну сироватку розводять 0,85% розчину натрію хлориду до 1:10, після чого підігрівають на водяній бані до 37°C. До підігрітої розведеної сироватки додають суспензію мікробних клітин мікроба-адсорбента з розрахунку кінцевої концентрації 1–1,5 мільярда клітин на 1 см³ сироватки. Суспензію інкубують за 37°C, постійно помішуючи на магнітній мішалці, протягом 30 хв. Аглютинат вилучають центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 20 хв., а сироватку повторно перевіряють у реакції аглютинації із гетерологічними видами бактерій. За потреби процес адсорбції повторюють.

2.6. Приготування розчину імунних ешерихіозних глобулінів

2.6.1. Після досягнення високої видоспецифічності згідно з пунктом 2.5.3 із ешерихіозної сироватки виділяють глобулінову фракцію білків шляхом осадження за допомогою насиченого розчину сульфату амонію.

2.6.2. До охолодженої до 0–4°C сироватки при постійному помішуванні на магнітній мішалці, повільно, крапля за краплею, додають рівний об'єм насиченого розчину сульфату амонію, також охолодженого до 0–4°C. Отриману суміш інкубують при температурі 0–4°C протягом 1 год., після чого центрифугують при 7000 обертів за температури 2–4°C. Надосадову рідину віддаляють, а осад глобулінів розчиняють у дистильованій воді, охолодженій до 4°C, і розбавляють до початкового обсягу неадсорбованої сироватки.

2.6.3 Процедуру переосадження глобулінової фракції сироватки насиченим розчином сульфату амонію, описану в пункті 2.6.2, повторюють ще раз. Після цього осад глобулінів розчиняють у мінімальному об'ємі 0,85%-го розчину натрію хлориду з рН 7,2–7,4

до повного розчинення, а отриманий розчин глобулінів додатково центрифугують за 4000 об/хв. для видалення можливих механічних домішок.

2.6.4. Для усунення надлишку сульфату амонію з отриманого розчину глобулінів застосовують процес діалізу або метод гелевої фільтрації.

2.6.5. Діаліз розчину глобулінів здійснюють у мішечках, виготовлених із спеціального целофану, протягом 2–3 діб при температурі 2–4°C, використовуючи 0,15 М розчин натрію хлориду з 0,01 М фосфатним буфером при рН 7,6. Діалізат замінюють 3–4 рази на добу.

2.6.6. Для приготування розчину для діалізу беруть 28,396 г Na_2HPO_4 і 27,218 г KH_2PO_4 . Обидві солі розчиняють окремо в літрі дистильованої води, отримуючи при цьому 0,2 М розчини вказаних солей. Потім змішують 900 cm^3 0,2 М розчину Na_2HPO_4 і 100 cm^3 0,2 М розчину KH_2PO_4 і отримують 0,1 М фосфатний буфер з рН 7,6.

Потім готують розчин натрію хлориду – розчиняють 320 г хімічно чистої кухонної солі у 2 л дистильованої води. Отриманий розчин поєднують у рівних об'ємах з 0,1 М фосфатним буфером. Маточний розчин зберігають у холодильнику в щільно закритій ємності. Для діалізу готують робочий розчин шляхом розведення 400 cm^3 маточного розчину 3600 cm^3 дистильованої води.

2.6.7. Наявність солей амонію в діалізаті визначають з допомогою реактиву Неслера. Для цього в одну пробірку беруть 10 cm^3 нічного діалізату, а в другу – 10 cm^3 розчину сульфату амонію в розведенні $1:3 \times 10^{-5}$ (контроль) і додають в кожную із них по 0,3 cm^3 33% розчину сегнетової солі. Після струшування додають по 0,3 cm^3 реактиву Неслера і знову струшують. Якщо діалізат пожовтів не більше, ніж контрольний розчин, діаліз припиняють.

2.6.8. Очищення розчину глобулінів від надлишку сульфату амонію методом гелевої фільтрації здійснюють на колонці, заповненій середньозернистим (G-50) сефадексом. Для цього використовують колонки висотою 40–60 см і діаметром 3 см.

2.6.9. Підготовка колонки до роботи починається із замочування сефадексу у високій склянці, наповненій дистильованою водою, з постійним перемішуванням. Для цього зважують сефадекс у кількості, що, з урахуванням набухання, забезпечує об'єм гелю 360–400 см³. Після цього частинки, що спливали, видаляють, а осад повторно суспендують у свіжій воді. Процедуру повторюють доти, поки не перестануть з'являтися на поверхні дрібні частинки. Після завершення процесу замочування сефадекс залишають на добу для повного набухання.

Заповнення колонки проводять суспензією набухлого сефадексу при закритому крані колонки, забезпечуючи його однорідне осідання. Колонку заповнюють за один прийом, щоб уникнути утворення шаруватості, при цьому стовпчик гелю повинен бути без повітряних бульбашок.

Гель урівноважують 0,1 М фосфатним буфером з рН 7,6, пропускаючи через колонку 2–3 об'єми вказаного розчину, рівних об'єму сефадексу в колонці.

2.6.10. Перед додаванням розчину глобулінів у колонку, буферний розчин, розташований на поверхні сефадексу, аплікують до рівня верхнього меніска гелю, що співпадає з рівнем стовпчика сефадексу. Розчин глобулінів обережно наносять на поверхню гелю, використовуючи пастерівську піпетку, при цьому кран колонки залишається закритим, щоб уникнути змішування.

Після цього кран обережно відкривають, колонку налаштовують на швидкість витікання елюату в межах 1–1,5 см³/хв. Після повного проникнення розчину глобулінів у сефадекс, колонку підключають до ємності з 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,6), який подається в колонку поступово, синхронно зі швидкістю витікання елюату.

Заповнена таким чином колонка дозволяє одноразово очистити 50–60 см³ глобулінів.

2.6.11. Для виявлення білка у фракціях, що виходять із колонки, використовують 5% розчин трихлороцтової кислоти. Краплю одержаної рідини наносять на предметне скло і змішують із краплею

цього розчину. Поява помутніння свідчить про наявність білкових сполук у досліджуваному зразку.

2.6.12. Наявність солей амонію у фракціях, що витікають, визначають реактивом Неслера, як описано в п. 2.7.

2.6.13. Об'єм розчину очищеної глобулінової фракції має відповідати або незначно перевищувати об'єм білкового розчину, введеного у хроматографічну колонку.

2.6.14. Колонку, заповнену сефадексом, допускається використовувати багаторазово. Для цього після кожної процедури гелевої фільтрації її промивають п'ятикратним об'ємом дистильованої води.

2.6.15. Видоспецифічні ешерихіозні глобуліни, очищені від сульфату амонію методом вичерпного діалізу (пп. 2.6.5–2.6.7) або гелевої фільтрації (пп. 2.6.8–2.6.14), після перевірки активності та специфічності (пп. 2.4.2–2.4.5) розливають у стерильні поліетиленові чи скляні ампули об'ємом 2–5 см³. Ампули закривають або герметично запаюють, маркують етикетками із зазначенням виду тварини-донора, дати виготовлення та робочого титру і зберігають за 2–4°C.

2.6.16. Періодично, з інтервалом у три місяці, здійснюють контроль титру глобулінів згідно з методикою, викладеною в п. 2.4.4. Глобуліни, титри яких в реакції непрямой імунофлуоресценції нижчі за 1:16, вважають непридатними для подальшого застосування.

2.7. Виготовлення флуоресціюючих ешерихіозних глобулінів

2.7.1. У розчині очищених ешерихіозних глобулінів визначають концентрацію білка за методом Лоурі або на спектрофотометрі (СФ-4, СФ-16) при довжині хвилі 260 нм.

2.7.2. З'єднання глобулінів з флуоресцеїном ізотіоціанатом (ФІТЦ) здійснюють шляхом приготування кон'югаційної суміші, що включає розчин глобулінів із концентрацією білка 15–25 мг/см³, 15% карбонатного буфера із рН 9,5 від загального об'єму суміші, а також ФІТЦ у співвідношенні 15 мг на 1 г білка глобулінів.

Спочатку ФІТЦ розчиняють у половині об'єму буфера для кон'югації, потім краплями при безперервному помішуванні додають до розчину глобулінів. Посудину, де розчинявся ФІТЦ, двічі промивають залишковим буфером. Кон'югаційну суміш витримують на магнітній мішалці при кімнатній температурі протягом 1 год., а далі 16–18 год. за температури 2–4°C.

2.7.3. Для приготування карбонатного буфера готують 0,5 М розчини Na_2CO_3 (5,3 г, розчинені в 100 см³ дистильованої води) та NaHCO_3 (4,2 г у 100 см³ дистильованої води). Щоб отримати буфер з рН 9,5, змішують у співвідношенні 2:8 розчини Na_2CO_3 і NaHCO_3 відповідно. Значення рН контролюють потенціометрично і за необхідності коригують пропорції розчинів.

2.7.4. Очищають мічені глобуліни від незв'язаного барвника діалізом або методом гелевої фільтрації.

2.7.5. Діаліз мічених ешерихіозних глобулінів виконують у целофанових мішках за температури 2–4°C протягом 4–6 днів, міняючи діалізат 3–4 рази на добу. Діаліз проводять проти 0,15 М розчину натрію хлориду з рН 7,6.

Приготування розчину для діалізу описано в п. 2.6.6.

2.7.6. Завершення діалізу визначають шляхом порівняння інтенсивності люмінесценції нічного діалізату під ультрафіолетовим випромінюванням із інтенсивністю люмінесценції контрольного розчину, яким виступає розчин ФІТЦ у розведенні $1:2 \times 10^{-3}$. Якщо світіння діалізату не перевищує світіння контрольного розчину, процес діалізу припиняють.

2.7.7. Очистку глобулінів, мічених ФІТЦ, від не зв'язаного барвника виконують за допомогою гелевої фільтрації згідно з методикою, викладеною в пунктах 2.6.9–2.6.10. Для урівноваження гелю в колонці та отримання елюату застосовують 0,1 М розчин натрію хлориду з рН 7,6.

Під час проходження неочищеного розчину через колонку, заповнену сефадексом, відбувається чітке розділення незв'язаного ФІТЦ і мічених глобулінів. В подальшому отриману фракцію мічених

глобулінів додатково піддають діалізу протягом 24 год. за температури 2–4°С проти 0,15 М розчину натрію хлориду з рН 7,6.

2.8. Контроль якості та умови зберігання мічених глобулінів

2.8.1. Мічені ФІТЦ ешерихіозні глобуліни використовують для оцінки активності та специфічності у прямому варіанті МФА відносно ентеропатогенних штамів *E. coli*.

2.8.2. Для виготовлення мікропрепаратів для постановки прямої імунофлуоресценції як антиген використовують суспензії мікробних клітин, підготовлені згідно з методикою, наведеною в п. 2.4.3, тих видів мікробів, які перераховані в п. 2.4.2.

2.8.3. На ретельно знежирених предметних скельцях, розділених за допомогою маркера на 10–12 рівних квадратів, готують 10–12 мазків із суспензії вегетативних клітин, підготовленої за методикою п. 2.4.3. Мазки підсушують і фіксують згідно з п. 2.4.4. Після цього на них наносять мічені глобуліни у двократних розведеннях, починаючи із максимального розведення, що як правило є на порядок нижчим від діагностичного розведення немічених глобулінів (наприклад 1:620), і закінчуючи розведенням 1:4. Препарати інкубують у вологій камері за 37°С протягом 30 хв., промивають проточною водою 10 хв., підсушують і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. Результати оцінюють за 4-плюсовою системою, як зазначено в п. 2.4.4.

Мікробні клітини *E. coli* мають демонструвати специфічне світіння на рівні чотирьох плюсів при обробці міченими глобулінами в розведенні не нижче 1:8, тоді як вегетативні клітини гетерологічних мікроорганізмів не повинні проявляти діагностичне світіння навіть при використанні нерозведених глобулінів.

2.8.4. Для контролю стерильності мічених ешерихіозних глобулінів, виконуючи посіви на середовища МПБ та МПА. Висіяні культури інкубують у термостаті протягом 3 діб, під час яких зразки повинні залишатися стерильними.

2.8.5. Мічені ешерихіозні глобуліни розливають у стерильні ампули, виготовлені з поліетилену або скла. На етикетках зазначають

об'єм (у см³), вид тварини-донора, дату виготовлення та робочий титр. Препарати зберігають за температури 2 – 4°С протягом 1 року.

2.8.6. Періодичну перевірку титрів глобулінів виконують кожні три місяці відповідно до методики, описаної в пункті 2.8.3. Глобуліни, які мають титр нижче 1:4, вважають непридатними для роботи.

3. СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235-6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
2. Mueller M, Tainter C.R. *Escherichia coli* Infection. [Updated 2023 Jul 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/
3. Малиш Н.Г., Чемич М.Д. Діареєгенні ешерихіози: захворюваність, етіологічний пейзаж, фактори ризику *Інфекційні хвороби*. 2014. №3. С. 45-53.
4. Безвершенко О.С., Зон Г.А. Результати вивчення епізоотичної ситуації щодо ешерихіозу при промисловому утриманні індиків. *Ветеринарна медицина*. Вип. 97. С.: 157-160.
5. Osińska A, Korzeniewska E, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Harnisz M, Jachimowicz P, Buta-Hubeny M, Zieliński W. The challenges in the identification of *Escherichia coli* from environmental samples and their genetic characterization. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2023 Jan;30(5):11572-11583. doi: 10.1007/s11356-022-22870-8.
6. Gaby Maier. Methods to reduce the risk of *E.coli* O157:H7 shedding in cattle. <https://www.wifss.ucdavis.edu/wp-content/uploads/documents>.
7. Jenkins C. Enterοaggregative *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018. 416 pp. 27–50. 10.1007/82_2018_105
8. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*. 2015. 6. 791.
9. Akiyama Y., Saito E., Futai H., Ogita K., Sakae H., Fukunaga M., Tsuji H., Chikahira M., Mimura M. Comprehensive study of pathogenic genes distributed in *Escherichia coli* isolated from cattle. *Food Hyg Saf Sci*. 2015. 56: 118–122C. doi.org/10.3358/shokueishi.56.118.