

Міністерство освіти і науки України
ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ЛЕСІ УКРАЇНКИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ПОРУЧИНСЬКИЙ БОГДАН АНДРІЙОВИЧ

УДК 579.84(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ
ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНА ІНДИКАЦІЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ
ЕНТЕРОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ *ESCHERICHIA COLI*
В БІОТИЧНИХ ТА АБІОТИЧНИХ ОБ'ЄКТАХ ДОВКІЛЛЯ

Спеціальність 091 Біологія

Галузь знань 09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Б. А. Поручинський

Науковий керівник
Бойко Петро Костянтинович,
доктор ветеринарних наук,
професор

Луцьк – 2025

АНОТАЦІЯ

Поручинський Б. А. Імунофлуоресцентна індикація та ідентифікація ентеропатогенних штамів *Escherichia coli* в біотичних та абіотичних об'єктах довкілля. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Волинський національний університет імені Лесі Українки МОН України, Луцьк, 2025.

E. coli – кишковий коменсал, який володіє низкою факторів патогенності, та, за впливу сприятливих чинників на чутливий організм, може спричиняти ураження шлунку та кишок або позакишкові інфекції (бактеріємію, абдомінальну інфекцію чи запалення органів малого таза, інфекції сечовивідних шляхів (ІСШ), інфікування ділянок хірургічного втручання, абсцеси головного мозку та ранові інфекції) в людей [9, 10, 109]. Захворювання, етіологічним чинником яких є ентеропатогенна кишкова паличка, мають назву ешерихіози [110, 115].

Ешерихіози людини є актуальною проблемою гуманної медицини, бо становлять небезпеку для здоров'я, а лікування та контроль ешерихіозів вимагає значних матеріальних затрат [71, 76, 123]. Ешерихіози поширені на всіх континентах світу, де мешкають люди.

Незважаючи на те, що будова, фізіологія та екологія *E. coli* серед усіх інших відомих бактерій досліджені найповніше, проте залишаються недостатньо вивченими її патогенетичні властивості, а також пов'язані з цим такі біологічні явища, як інфекційний та епідемічний (епізоотичний) процеси [44, 55]. Їхній аналіз дає змогу встановити пріоритетність основних рушійних сил епідемічного процесу ешерихіозів і на цій основі вибудовувати стратегію ефективного контролю та профілактики цієї інфекції. Лікування, профілактика та контроль ешерихіозів вимагають значних матеріальних ресурсів у сфері охорони здоров'я [109, 128, 137]. Ешерихіози тварин не тільки завдають

значних економічних збитків господарствам, які займаються виробництвом тваринницької продукції, але й продуктивні тварини – це потенційне джерело і природний резервуар ентеропатогенних кишкових паличок (ЕРЕС) [4, 8, 110].

Успішність боротьби з ешерихіозами людини залежить від багатьох чинників, зокрема зоологічних. Так, циркуляція (ЕПКП) в популяціях продуктивних сільськогосподарських, домашніх та диких тварин сприяє не лише виживанню, але й підтриманню вірулентних властивостей *E. coli* на популяційному рівні, і цим сприяє функціонуванню епізоотичного процесу тварин та епідемічного процесу ешерихіозів людини [68, 117, 132].

Ідентифікація ентеротоксигенних *E. coli* сьогодні є складною. Вона базується на безпосередньому виявленні ентеротоксинів або генів токсинуутворення в хромосомних чи позахромосомних генетичних структурах. Патогенні та непатогенні ешерихії не диференціюють за морфологічними, ферментними, культуральними властивостями. Кишкова паличка може бути частиною нормальної мікробіоти кишечника і представлена як непатогенними, так і патогенними штамми, тому надзвичайно актуальними є індикація та ідентифікація ентеропатогенних штамів безпосередньо в досліджуваному матеріалі або отриманих виділених ізолятах *E. coli*.

Мета дослідження – розроблення експрес-методу індикації та ідентифікації ентеропатогенних ізолятів *E. coli* за допомогою реакції імунофлуоресценції.

Для досягнення цієї мети необхідно виконати такі завдання:

- виділення з епідемічних та епізоотичних вогнищ ентеропатогенних ізолятів *E. coli* з наступною їхньою ідентифікацією за морфологічними ознаками, тинкторіальними, культуральними, біохімічними, антигенними та біологічними властивостями;

- відбір ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli* та виготовлення на його основі вакцинних препаратів і вивчення їхніх антигенних властивостей;
- підбір тварин-донорів, апробація схем їхньої імунізації, отримання імунної ешерихіозної сироватки та вивчення її активності й специфічності до поверхневих антигенів гомологічних та гетерологічних видів бактерій у реакції аглютинації;
- виготовлення високоспецифічних мічених флуоресцеїну ізотіоціанатом (ФІТЦ) ешерихіозних глобулінів;
- вивчення чутливості та діагностичної цінності мічених ешерихіозних глобулінів в реакції прямої імунофлуоресценції.

Продовольча безпека країни демонструє такий рівень продовольчого забезпечення населення якісною та безпечною продукцією, який гарантує соціально-політичну стабільність у суспільстві, виживання та розвиток нації, особи, сім'ї, сталий економічний розвиток. Проблема продовольчої безпеки не має кон'юнктурного характеру. Вона буде існувати доти, поки є держава, визначальним чинником сили та авторитету якої є підтримання відповідного рівня продовольчої безпеки. Підтвердженням цього є правове забезпечення та постійна увага до проблем продовольчої безпеки в країнах ЄС, США, Японії та інших розвинутих регіонах світу [8, 39, 123].

Під час аналізу мікробіологічного стану відкритих водойм та систем водопостачання України та Волинської області зокрема за період 2020–2024 рр, ми виявили загальнодержавну тенденцію до зростання частки проб із наднормовими показниками у відкритих водоймах. Аналіз питної води показав вищу надійність комунальних водопроводів порівняно з сільськими мережами та колодязями. Отримані результати свідчать про необхідність подальшого систематичного моніторингу мікробіологічних показників води з метою стабілізації санітарного стану водних ресурсів і зниження ризиків для продовольчої безпеки та загалом здоров'я населення.

У комплексі проблем забезпечення продовольчої безпеки України важливу роль відіграє також моніторинг тваринницької продукції за показниками якості та безпечності. Моніторинг якості та безпечності сільськогосподарської продукції є складовою стратегії «Єдине здоров'я». Основними завданнями цієї стратегії в межах повноважень ветеринарної медицини є збір, аналіз і систематизація інформації щодо забрудненості кормів і продукції тваринництва залишками агрохімікатів, ветеринарними препаратами, різноманітними токсичними речовинами та біотичними контамінантами [2, 8, 146]. До останніх відносять низку токсиковарів ентеропатогенних штамів кишкової палички [75, 117]. Зважаючи на це, розроблення експрес-методів виявлення та ідентифікації різноманітних патогенних біоконтамінантів відноситься до основних завдань науково-методичного забезпечення моніторингу безпечності продукції тваринного походження, а отже, є актуальною темою наукових пошуків [131, 133]. Одним із перспективних методів експрес-індикації та ідентифікації токсигенних штамів *E. coli* в об'єктах довкілля та біоматеріалах із погляду ефективності (швидкості у виконанні, недороговартісності та високої специфічності) є метод флуоресціюючих антитіл, бо він поєднує в собі об'єктивність мікроскопічного методу та високу специфічність імунологічних реакцій [99, 104]. Чутливість та специфічність імунофлуоресцентного методу залежить від багатьох чинників, зокрема від антигенності вакцинних препаратів, схем імунізації та виду тварин-донорів [20, 98].

Із врахуванням всіх згаданих вище чинників, ми отримали високоактивні видоспецифічні мічені імунні ешерихіозні глобуліни для індикації та ідентифікації ентеропатогенних за показником β -гемолітичності кишкових паличок в абіотичних та біотичних об'єктах довкілля в реакції прямої імунофлуоресценції. Лабораторні випробування показали високу діагностичну та економічну ефективність застосування прямого варіанту МФА як експрес-методу імуно-баткеріологічного скринінгу циркулювання ентеропатогенних

кишкових паличок у ветеринарно-санітарного нагляду та клінічних зразках від хворих або підозрілих у захворюванні на кишкові інфекції людей і тварин.

Ключові слова: ешерихіози, ентеробактерія, епідеміологія, епізоотологія, ВРХ, захворюваність, поширеність, діагностика, показники сироватки крові, біорізноманіття, екологія, резистентність, імунологія.

SUMMARY

Poruchynskiy B.A. Immunofluorescent indication and identification of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* in biotic and abiotic environmental objects. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree in specialty 091 Biology. - Lesya Ukrainka Volyn National University of the Ministry of Education and Culture of Ukraine, Lutsk, 2025.

E. coli is an intestinal commensal that has a number of pathogenicity factors and, under the influence of favorable conditions on a susceptible organism, can cause lesions of the stomach and intestines or extraintestinal infections (bacteremia, abdominal infection or inflammation of the pelvic organs, urinary tract infections (UTIs), infections of surgical sites, brain abscesses, and wound infections) in humans [9, 10, 109]. Diseases for which the etiological agent is enteropathogenic *Escherichia coli* are called escherichioses [110, 115].

Human escherichioses are a relevant issue in human medicine because they pose a threat to human's health, and the treatment and control of escherichioses require significant material resources [71, 76, 123]. Escherichioses are widespread on all continents inhabited by humans.

Although the structure, physiology, and ecology of *E. coli* are among the most thoroughly studied of all known bacteria, its pathogenic properties and related biological phenomena, such as infectious and epidemic (epizootic) processes, remain insufficiently explored [44, 55]. Studying them will make it possible to identify the primary driving forces of the epidemic process of escherichioses and,

on this basis, to develop strategies for effective control and prevention of this infection. The treatment, prevention, and control of escherichioses require considerable material resources in the field of healthcare [109, 128, 137]. Animal escherichioses not only cause significant economic losses to farms engaged in livestock production, but productive animals also serve as a potential source and natural reservoir of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) [4, 8, 110].

The success of combating human escherichioses depends on many factors, particularly zoological ones. Thus, the circulation (EPEC) in populations of productive farm, domestic, and wild animals contributes not only to the survival but also to the maintenance of the virulent properties of *E. coli* at the population level, thereby supporting the functioning of the epizootic process in animals and the epidemic process of human escherichioses [68, 117, 132].

Identification of enterotoxigenic *E. coli* is currently a complex process and is based on the direct detection of enterotoxins or the identification of toxin-producing genes in chromosomal or extrachromosomal genetic structures. Pathogenic and nonpathogenic *Escherichia* strains are not differentiated by morphological, enzymatic, or cultural characteristics. *E. coli* can be part of the normal intestinal microbiota and may include both nonpathogenic and pathogenic strains; therefore, the indication and identification of enteropathogenic strains directly in the examined material or in the isolated *E. coli* cultures is an extremely relevant task.

The aim of the study is to develop an express method for the indication and identification of enteropathogenic *E. coli* isolates using the immunofluorescence reaction.

To achieve this goal, it is necessary to accomplish the following tasks:

- to isolate enteropathogenic *E. coli* from epidemic and epizootic foci, followed by their identification based on morphological, staining, cultural, biochemical, antigenic, and biological properties;
- to select an enterotoxigenic β -hemolytic strain of *E. coli*, prepare vaccine preparations based on it, and study their antigenic properties;

- to select donor animals, test immunization schemes, obtain immune anti-escherichiosis serum, and study its activity and specificity to surface antigens of homologous and heterologous bacterial species in the agglutination reaction;
- to produce highly specific FITC-labeled anti-escherichiosis globulins;
- to study the sensitivity and diagnostic value of labeled anti-escherichiosis globulins in the direct immunofluorescence reaction.

Food security of a country represents such a level of provision of the population with high-quality and safe food products that guarantees socio-political stability in society, the survival and development of the nation, the individual and the family, as well as sustainable economic development. The issue of food security is not situational or temporary. It will exist as long as the state exists, whose strength and authority are determined by its ability to maintain an adequate level of food security. This is confirmed by the legal frameworks and the continuous attention to food security issues in the EU, the USA, Japan and other developed regions of the world [8, 39, 123].

The analysis of the microbiological state of open water bodies and water supply systems in Ukraine, particularly in the Volyn region, during the period of 2020–2024, revealed a nationwide trend toward an increasing proportion of samples exceeding established safety standards in open water bodies. Drinking water analysis demonstrated the higher reliability of municipal water supply systems compared to rural networks and wells. The results underscore the necessity for continued systematic monitoring of microbiological water indicators to stabilize the sanitary condition of water resources and mitigate risks to food security and public health.

Furthermore, within the framework of ensuring Ukraine's Food Security, an important place is occupied by the monitoring of livestock products in terms of quality and safety indicators. Monitoring the quality and safety of agricultural products is an integral part of the "One Health" strategy. The main tasks of this strategy within the powers of veterinary medicine include the collection, analysis, and systematization of information regarding the contamination of feed and

livestock products with residues of agrochemicals, veterinary drugs, various toxic substances, and biotic contaminants [2, 8, 146]. The latter include a number of toxico-variants of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* [75, 117]. Therefore, the development of express methods for the detection and identification of various pathogenic biocontaminants is among the main tasks of scientific and methodological support for monitoring the safety of products of animal origin and is thus a relevant topic for scientific research [131, 133]. One of the promising methods for express indication and identification of toxigenic strains of *E. coli* in environmental objects and biological materials, from the standpoint of efficiency (speed of execution, low cost, and specificity), is the fluorescent antibody method, as it combines the objectivity of microscopic examination with the high specificity of immunological reactions [99, 104]. The sensitivity and specificity of the immunofluorescence method depend on many factors, in particular on the antigenicity of vaccine preparations, immunization schemes, and the species of donor animals [20, 98].

Taking into account all the factors mentioned above, we obtained highly active, species-specific labeled immune escherichiosis globulins for the indication and identification of β -hemolytic enteropathogenic *E. coli* in abiotic and biotic environmental objects using the direct immunofluorescence reaction. Laboratory tests showed high diagnostic and economic efficiency in the use of the direct variant of the FAT as an express method for immuno-bacteriological screening of the circulation of enteropathogenic *E. coli* in veterinary-sanitary surveillance and clinical samples from humans and animals who are ill or suspected of having intestinal infections.

Keywords: escherichioses, enterobacterium, epidemiology, epizootiology, cattle, morbidity, prevalence, diagnostics, blood serum indicators, biodiversity, ecology, resistance, immunology.

Список публікацій здобувача:

– включені до переліку фахових видань України:

1. Бойко, О., Титюк, О., Панівська, О., Поручинський, Б., Бойко, П. Можливості імунофлуоресцентного методу в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб. *Нотатки сучасної біології*, 2021. №1. С. 93–101.

<https://doi.org/10.29038/NCBio.21.1.93-101> Дисертантом проведено аналіз та узагальнення частини літературних джерел за темою дослідження та інтерпретацію отриманих результатів. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником та співавторами.

2. Поручинський Б. А., Бойко П. К. Підбір тварин-донорів для виготовлення імунних ешерихіозних діагностичних сироваток. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2025. 1(196). С. 67–74.

<https://doi.org/10.33245/2310-4902-2025-196-1-67-74> Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.

3. Поручинський Б. А., Бойко П. К. Динаміка цитоморфологічних, біохімічних та імунологічних показників крові тварин-донорів в процесі їх імунізації вакцинними препаратами, виготовленими із ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli*. *Нотатки сучасної біології*. 2025. Т. 9, № 1. С. 87-93.

URL: <https://doi.org/10.29038/ncbio.25.1-1> Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.

4. Поручинський Б.А., Бойко П.К. Вивчення специфічності імунної ешерихіозної сироватки. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 2025, № 2

С. 59-64. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2025-200-2-59-64>.

Дисертантом проведено аналіз частини літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано

отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником та співавторами.

– тези у збірниках міжнародних конференцій/конгресів/симпозіумів (апробація результатів дисертаційної праці):

5. Бойко П. К., Поручинський Б. А. Отримання імунних сироваток до антигенів β -гемолітичного штаму *Escherichia coli* метою виготовлення мічених ешерихіозних діагностиків. *Збірник матеріалів Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції «Єдине здоров'я»: реалії і перспективи*. (5–6 листопада 2024 р., м. Житомир). Житомир : ПНУ, 2024. С. 179–182. Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.

6. Поручинський Б., Бойко П. Сучасні підходи до діагностики ешерихіозів: порівняльна характеристика чутливості лабораторних методів. *Актуальні проблеми розвитку природничих та гуманітарних наук: збірник матеріалів IX Міжнародної науково-практичної конференції* (14 листопада 2025 р., м. Луцьк). Луцьк: ВНУ ім. Лесі Українки, 2025. С. 154-156. Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.

7. Поручинський Б. А. Дослідження біохімічних властивостей ентеропатогенних та коменсальних штамів *E. coli*. *Збірник матеріалів Буковинського міжнародного медико-фармацевтичного конгресу студентів і молодих учених, ВІМСО*. Чернівці, 2024. С. 110.

8. Поручинський Б. А., Бойко П. К. Порівняльна оцінка морфологічних ознак, тинкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей трьох ізолятів кишкової палички, виділених із різних джерел / *Збірник матеріалів XX конгресу Світової федерації українських лікарських товариств* (24-26 жовтня 2024 р., м.

Луцьк). Українські Медичні Вісті. Т. 16. № 3–4 (100–101). 2024. С. 69. Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.

9. Поручинський Б. А., Бойко О. П., Бойко П. К. Вивчення специфічності сироватки, отриманої до ОН-антигену *E. coli*. *Сучасні аспекти лікування і профілактики хвороб тварин: матеріали ІХ Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції (22-23 жовтня 2025 р., м. Полтава)*. Полтава: ПАВМ, 2025. С. 180-181. Дисертантом проведено аналіз та узагальнення частини літературних джерел за темою дослідження та інтерпретацію отриманих результатів. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником та співавторами.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	15
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Ешерихіози як нозологічна одиниця інфекційної патології	26
1.2. Загальна характеристика представників родини <i>Escherichiaceae</i>	28
1.2.1. Таксономічне положення бактерій роду <i>Escherichia</i>	28
1.2.2. Морфологічні ознаки, тинкторіальні, культуральні, біохімічні та біологічні властивості кишкової палички	29
1.2.3. Антигенні властивості та фактори патогенності <i>E. coli</i>	31
1.2.4. Стійкість до дії фізичних, хімічних та біологічних факторів. Антибіотикорезистентність <i>E. coli</i>	37
1.3. Епідеміологія та епізоотологія ешерихіозів	39
1.4. Діагностика ешерихіозів	41
1.4.1. Методи прямої індикації та ідентифікації збудника ешерихіозу ...	41
1.4.2. Метод епідеміологічного та епізоотологічного аналізу	43
1.5. Узагальнення результатів літературного огляду	46
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	48
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	61
3.1. Епідеміологічні аспекти ешерихіозів людини у країнах світу та в Україні	61
3.2. Епідеміологічний аналіз стану контамінації води відкритих водойм та систем водопостачання у Волинській області за період 2020–2024 рр.....	71
3.3. Порівняльна характеристика ізолятів <i>E. coli</i> , виділених із різних епідемічних та епізоотичних джерел	78
3.3.1. Мікроскопічне дослідження штамів	78

	14
3.3.2. Опис культур досліджуваних штамів на поживних середовищах ..	79
3.3.3. Дослідження біохімічних властивостей штамів <i>E.coli</i>	80
3.3.4. Дослідження біохімічних властивостей штамів <i>E.coli</i> за допомогою набору Rapid ID32 E	82
3.3.5. Дослідження антибіотикорезистентності штамів <i>E.coli</i>	84
3.3.6. Дослідження біологічних властивостей різних штамів <i>E.coli</i>	85
3.4. Одержання та застосування мічених ФІТЦ видоспецифічних ешерихіозних глобулінів	87
3.4.1. Порівняльна оцінка схем імунізації та підбір тварин-донорів для отримання імунних ешерихіозних сироваток	87
3.4.2. Отримання імунних ешерихіозних сироваток	91
3.4.3. Оцінка активності та специфічності ешерихіозної сироватки	98
3.4.4. Одержання видоспецифічних ешерихіозних сироваток	100
3.4.5. Виготовлення флуоресціюючих ешерихіозних глобулінів	103
3.4.6. Визначення оптимальних умов застосування мічених ешерихіозних глобулінів	106
3.4.7. Визначення чутливості та діагностичної цінності МФА з метою індикації та ідентифікації ентеропатогенних β -гемолітичних ізолятів <i>E. coli</i> з допомогою мічених ешерихіозних глобулінів	108
3.5. Економічний ефект від застосування МФА як експрес-методу індикації та ідентифікації ентеропатогенних кишкових паличок в об'єктах довкілля та біоматеріалах від хворих з підозрою на ешерихіози	118
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	123
ВИСНОВКИ	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	140
ДОДАТКИ	162

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я
ВРХ	– велика рогата худоба
ДЕ	– діареєгенні ешерихіози
ЕІКП	– ентероінвазивні кишкові палички
ЗПВ	– забуферена пептонна вода
ІСШ	– інфекція сечовивідних шляхів
КМПА	– Кров'яний м'ясо-пептонний агар
КУО	– колонієутворюючі одиниці
МЕБ	– Міжнародне епізоотичне бюро
МПБ	– М'ясо-пептонний бульйон
МПА	– М'ясо-пептонний агар
МР	– мультирезистентність
МФА	– метод флуоресціюючих антитіл
НААН	– Національна академія аграрних наук
ПЛР	– полімеразно-ланцюгова реакція
РІФ	– реакція імунофлуоресценції
РА	– реакція аглютинації
ТСДБ	– триптон-соєвий дріжджовий бульйон
ФА	– фагоцитарна активність
ФІ	– фагоцитарний індекс
ФІТЦ	– флуоресцеїну ізотіоціанат
УПКП/ UPEC	– уропатогенні кишкові палички
АІЕС	– адгерентно-інвазивні <i>Escherichia coli</i>
CNF	– цитотоксин некротизуючий фактор
DEC	– діареєгенні <i>Escherichia coli</i>
ЕАЕС	– ентероагративна <i>Escherichia coli</i>

EHEC	– ентерогеморагічні <i>Escherichia coli</i>
EPEC	– ентеропатогенні <i>Escherichia coli</i>
ESBL	– β -лактамази розширеного спектру
ETEC	– ентеротоксикогенні <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	– патогенні позакишкові <i>Escherichia coli</i>
HUS	– гемолітико-уремічний синдром
LPS	– ліпополісахариди
psm	– осіб/100 тис. населення
STEC	– шига-токсикогенні <i>Escherichia coli</i>
Stx	– шига-подібні токсини
VTEC	– вероцитотоксикогенні <i>Escherichia coli</i>

ВСТУП

Актуальність теми. Ешерихіози поширені на всіх континентах світу, де мешкають люди. Про це свідчать наукові публікації, звіти ВООЗ та інших наукових та лікувально-діагностичних установ [8, 69, 71].

Кишкова паличка – постійний мешканець товстого кишечника. У біотопах як теплокровних, так і холоднокровних організмів кишкові палички ведуть себе як синергісти, рідше як коменсали, забезпечуючи своїх господарів вітамінами групи В [139]. Кишкові палички утворюють низку біологічно активних речовин, зокрема низькомолекулярні пептиди – засоби міжклітинної комунікації, мікроцини, коліцини та ін. [42, 118].

Ці бактерії наявні скрізь, де є фекальне забруднення. Зважаючи на це, спеціалісти санітарно-епідеміологічних станцій використовують виявлення кишкових паличок як індикатор забруднення фекаліями джерел водопостачання, питної води та продуктів харчування, тобто в таких випадках кишкова паличка постає санітарно-показовим мікроорганізмом [41, 123].

Кишкові палички в абіотичному середовищі (грунт, вода) беруть участь у колообігу речовин, мінералізуючи прості вуглеводи [28].

- Перебуваючи в організмі продуктивних тварин (велика рогата худоба, свині, птиця), ентеропатогенні кишкові палички можуть спричиняти в останніх клінічно виражені інфекційні захворювання, такі як колібактеріоз, набрякова хвороба [155].

Проте, потрапляючи в організм продуктивних тварин, ентеропатогенні кишкові палички здебільшого не викликають клінічно виражених інфекційних захворювань, більше того – навіть не спричиняють розвитку прихованого інфекційного процесу, але через продукти харчування тваринного походження можуть потрапляти в організм людини і бути природним резервуаром ентеропатогенної кишкової палички та становити потенційні біоризики для здоров'я людей [53, 68].

Кишкова паличка як факультативний анаероб флори товстої кишки людини зазвичай колонізує шлунково-кишковий тракт немовляти у перші години від народження, і після цього *E. coli* та хазяїн отримують взаємну користь [166].

У той же час патогенні штами *E. coli* можуть викликати в людей інфекції, що проявляються трьома клінічними синдромами, зокрема інфекцією сечовивідних шляхів, сепсисом і менінгітом та кишково-діарейними захворюваннями [26, 109].

Шига-токсин продукуючі штами *E. coli* зазвичай мають зоонозне походження, спричиняють спалахи захворювань харчового походження і є однією із основних причин гострої ниркової недостатності в маленьких дітей [126].

Захворювання, спричинені кишковою паличкою, становлять 80% всіх інфекцій сечовивідних шляхів (ІСШ) (цистит та гострий пієлонефрит). Вважають, що більшість із них зумовлені мікроорганізмами, які походять з мікробіоти фекалій пацієнта. ІСШ спостерігаються частіше у жінок, ніж у чоловіків [26, 109].

Низка діареєгенних штамів ентеропатогенних кишкових паличок спричиняє діарею мандрівників [41].

В Україні розроблення методів сучасної діагностики, заходів профілактики, засобів та протоколів лікування ешерихіозів, вивчення епідеміологічних особливостей цієї інфекції є нагальною і дуже актуальною проблемою [3, 32].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи кафедри гістології та медичної біології Волинського національного університету імені Лесі Українки «Імунофлуоресцентна індикація та ідентифікація ентеропатогенних штамів *E. coli* за діагностики дисбіозів людини і тварин». Номер державної реєстрації в НДДКР 0124U004560.

Мета та завдання дослідження. Мета дослідження – розроблення експрес-методу індикації та ідентифікації ентеропатогенних ізолятів *E. coli* за допомогою реакції імунофлуоресценції.

Для досягнення цієї мети необхідно виконати такі завдання:

- виділення із епідемічних та епізоотичних вогнищ ентеропатогенних ізолятів *E. coli* з наступною їхньою ідентифікацією за морфологічними ознаками, тинкторіальними, культуральними, біохімічними, антигенними та біологічними властивостями;
- відбір ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli* та виготовлення на його основі вакцинних препаратів і вивчення їхніх антигенних властивостей;
- підбір тварин-донорів, апробація схем їхньої імунізації, отримання імунної ешерихіозної сироватки та вивчення її активності і специфічності до поверхневих антигенів гомологічних та гетерологічних видів бактерій у реакції аглютинації;
- виготовлення високоспецифічних мічених ФІТЦ ешерихіозних глобулінів;
- вивчення чутливості та діагностичної цінності мічених ешерихіозних глобулінів у реакції прямої імунофлуоресценції.

Об'єкт дослідження – ешерихіози людини і тварин.

Предмет дослідження – бактеріологічні методи виділення та ідентифікації ентеропатогенної кишкової палички.

Методи дослідження:

- метод епідеміологічного та епізоотологічного аналізу, який включав методику збору матеріалу, його систематику та аналіз з метою виявлення особливостей прояву епідемічного та епізоотичного процесів за ешерихіозів людини і тварин;

- клінічний: загальний огляд, пальпація, термометрія тварин-донорів перед початком та в період їхньої імунізації з метою отримання видоспецифічних ешерихіозних сироваток;
- патологоанатомічний: візуальне дослідження стану паренхіматозних органів та кишечника білих мишей за експериментального ешерихіозу з метою підтвердження (встановлення) ентеропатогенності ізолятів кишкової палички, та відновлення вірулентних властивостей виробничо-контрольних штамів *E. coli*;
- мікроскопічний:
 - 1) звичайна світлова мікроскопія мазків-відбитків із паренхіматозних органів і лімфатичних вузлів білих мишей, які загинули внаслідок експериментального ешерихіозу, спричиненого ентеропатогенними *E. coli*, а також мікропрепаратів із культур свіжовиділених ізолятів та виробничо-контрольних штамів *E. coli*, пофарбованих за методом Грама;
 - 2) люмінесцентна мікроскопія мазків-відбитків і культур, оброблених міченими ФІТЦ ешерихіозними глобулінами;
- бактеріологічний: виділення культур кишкової палички із різних біоматеріалів на таких живильних середовищах як: забуферена пептонна вода, м'ясо-пептонний бульйон, м'ясо-пептонний агар, середовища Ендо і Левіна;
- біохімічний з метою ідентифікації ізолятів кишкової палички на середовищах, що входять до повного кольорового ряду, на кров'яному м'ясо-пептонному агарі;
- імунологічний:
 - 1) розгорнута реакція аглютинації з метою визначення рівня аглютинінів у сироватці крові імунізованих тварин-донорів;
 - 2) реакція імунофлуоресценції у прямому варіанті з метою ідентифікації ентеропатогенних штамів *E. coli*;
- біологічний як метод встановлення ентеропатогенності.

Наукова новизна отриманих результатів. Проведено аналіз особливостей прояву епідемічного та епізоотичного процесів ешерихіозів людини і тварин у країнах світу та в Україні за період з 2000 по 2024 роки; уперше в Україні на основі комплексного аналізу даних наукової літератури зроблено спробу показати взаємозв'язок між епідемічним і епізоотичним процесами ешерихіозів та абіотичним середовищем, зокрема харчовим ланцюгом «від поля до столу», яке може бути природним резервуаром патотипів *E. coli*, що актуалізує необхідність розроблення експрес-методів виявлення маркерів ентеропатогенності в ізолятів кишкової палички, які циркулюють в біотичних та абіотичних об'єктах довкілля; на основі наукового підходу розроблено методику виготовлення вакцинних препаратів із ентеропатогенного за β -гемолітичністю штаму *E. coli*, схему імунізації тварин-донорів з метою отримання високо активних видоспецифічних ешерихіозних сироваток.

Практичне значення отриманих результатів. Результати проведених досліджень стали науковою підставою для розроблення технології виготовлення та методології застосування мічених видоспецифічних ешерихіозних глобулінів для виявлення ентеропатогенних за показником β -гемолітичності кишкових паличок.

Отримані результати вказують на перспективність подальших наукових пошуків із метою проведення імунофлуоресцентного скринінгу на наявність ентеропатогенних штамів *E. coli* в біотичних та абіотичних об'єктах харчового ланцюга «від поля до столу» і здійснення превентивних заходів, спрямованих на елімінацію з цього ланцюга продуктів, інфікованих зазначеними мікроорганізмами.

Основні результати проведених досліджень застосовують у навчальних програмах з епізоотології Національного університету біоресурсів і природокористування, Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Ґжицького, Поліського національного

університету, мікробіології Волинського національного університету імені Лесі Українки (див. Додатки А1-А5).

Особистий внесок здобувача. Автором особисто здійснено інформаційний пошук, зокрема із залученням електронних засобів, визначено мету та завдання наукової роботи, відбір методик до проведення польових та лабораторних досліджень, відпрацьовано моделі, відповідно до яких особисто виконано експериментальні дослідження. Проведено оформлення одержаних результатів у вигляді таблиць та графіків, здійснено їхній епідеміологічний та епізоотологічний аналіз, сформульовано практичні рекомендації для спеціалістів діагностичних лабораторій медичного, ветеринарного та фітопатологічного напрямів, а також представлено висновки роботи.

Виконано низку оригінальних досліджень з виготовлення різних антигенних препаратів *E. coli*, вивчення антигенності вакцинних препаратів, проведено порівняльну оцінку схем імунізації тварин-донорів різних видів, визначення чутливості та специфічності методу флуоресціюючих антитіл з метою виявлення та диференціації ентеропатогенних ізолятів кишкової палички в абіотичних та біотичних об'єктах довкілля.

Автор виконав розрахунки економічної ефективності імунофлуоресцентного методу індикації та ідентифікації ентеропатогенних штамів *E. coli* порівняно з бактеріологічним, який базується на детальному вивченні морфологічно-тинкторіальних та культурально-біохімічних властивостей ізолятів кишкової палички.

Усі положення та висновки дисертації належать автору.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційного дослідження були представлені на засіданнях кафедри гістології та медичної біології Волинського національного університету імені Лесі Українки та апробовані на науково-практичних конференціях.

Список публікацій здобувача:

– включені до переліку фахових видань України:

1. Бойко О., Титюк О., Панівська О., Поручинський Б., Бойко П. Можливості імунофлуоресцентного методу в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб. *Нотатки сучасної біології*, 2021. №1. С. 93–101. <https://doi.org/10.29038/NCBio.21.1.93-101> Дисертантом проведено аналіз та узагальнення частини літературних джерел за темою дослідження та інтерпретацію отриманих результатів. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником та співавторами.
2. Поручинський Б. А., Бойко П. К. Підбір тварин-донорів для виготовлення імунних ешерихіозних діагностичних сироваток. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2025. 1(196). С. 67–74. <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2025-196-1-67-74> Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.
3. Поручинський Б. А., Бойко П. К. Динаміка цитоморфологічних, біохімічних та імунологічних показників крові тварин-донорів в процесі їх імунізації вакцинними препаратами, виготовленими із ентеротоксигенного β –гемолітичного штаму *E. coli*. *Нотатки сучасної біології*. 2025. Т. 9, № 1. С. 87-93. URL: <https://doi.org/10.29038/ncbio.25.1-1> Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.
4. Поручинський Б.А., Бойко П.К. Вивчення специфічності імунної ешерихіозної сироватки. *Науковий вісник ветеринарної медицини*, 2025. № 2. С. 59-64. URL: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2025-200-2-59-64>. Дисертантом проведено аналіз частини літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано

отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником та співавторами.

– тези у збірниках міжнародних конференцій/конгресів/симпозіумів (апробація результатів дисертаційного дослідження):

5. Бойко П. К., Поручинський Б. А. Отримання імунних сироваток до антигенів β -гемолітичного штаму *Escherichia coli* метою виготовлення мічених ешерихіозних діагностиків. *Збірник матеріалів Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції «Єдине здоров'я»: реалії і перспективи*. (5–6 листопада 2024 р., м. Житомир). Житомир : ПНУ, 2024. С. 179–182. Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.

6. Поручинський Б., Бойко П. Сучасні підходи до діагностики ешерихіозів: порівняльна характеристика чутливості лабораторних методів. *Актуальні проблеми розвитку природничих та гуманітарних наук: збірник матеріалів IX Міжнародної науково-практичної конференції* (14 листопада 2025 р., м. Луцьк). Луцьк: ВНУ ім. Лесі Українки, 2025. С. 154-156. Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.

7. Поручинський Б. А. Дослідження біохімічних властивостей ентеропатогенних та коменсальних штамів *E. coli*. *Збірник матеріалів Буковинського міжнародного медико-фармацевтичного конгресу студентів і молодих учених, ВІМСО*. Чернівці, 2024. С. 110.

8. Поручинський Б. А., Бойко П. К. Порівняльна оцінка морфологічних ознак, тинкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей трьох ізолятів кишкової палички, виділених із різних джерел /

Збірник матеріалів XX конгресу світової федерації українських лікарських товариств. (24-26 жовтня 2024 р., м. Луцьк). Українські Медичні Вісті. Т. 16. № 3–4 (100–101). 2024. С. 69. Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, виконано експериментальні дослідження та інтерпретовано отримані результати. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником.

9. Поручинський Б. А., Бойко О. П., Бойко П. К. Вивчення специфічності сироватки, отриманої до ОН-антигену *E. coli*. *Сучасні аспекти лікування і профілактики хвороб тварин: матеріали IX Всеукраїнської науково-практичної Інтернет-конференції* (22-23 жовтня 2025 р., м. Полтава). Полтава: ПАВМ, 2025. С. 180-181. Дисертантом проведено аналіз та узагальнення частини літературних джерел за темою дослідження та інтерпретацію отриманих результатів. Аналіз результатів досліджень здійснено спільно з науковим керівником та співавторами.

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна праця викладена на 161 сторінці комп'ютерного тексту і містить вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень, узагальнення отриманих результатів, висновки, список використаної літератури включає 167 найменувань. Робота ілюстрована 20 таблицями та 13 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ешерихіози як нозологічна одиниця інфекційної патології

Escherichia coli (кишкова паличка) є найвідомішим та, можливо, найбільш вивченим у гуманній та ветеринарній медицині представником мікробного світу [92]. Історія вивчення цього організму починається з 1885 р., коли Теодор Ешеріх, намагаючись знайти причини дитячої діареї, вперше описав нерегульовану масу кишкових бактерій, виділених з випорожнень немовлят, яка була названа *Bacterium coli commune* [79]. У ранній період вивчення *E. coli* вважалася виключно представником нормальної мікрофлори кишечника людини і тварин, проте у своїй монографії 1886 року «Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung» Т. Ешеріх вперше описав патогенні *E. coli* у тваринних екскрементах, а Кастеллані та Чалмерс у 1919 році запропонували сучасну назву кишкової палички. Проте, офіційно Міжнародним комітетом із систематики прокаріотів вона була визнана лише в 1958 році [72].

Втім, питання щодо ролі *E. coli* у виникненні та розвитку інфекцій залишалося предметом наукових дискусій. Коменсал, умовно-патогенний мікроорганізм, опортуніст, факультативний патоген, провідний етіологічний агент або ентеропатоген – це основні категорії, у межах яких його характеризують дослідники [56]. Водночас інші представники родини Enterobacteriaceae, зокрема *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, мають подібне середовище існування та широку екологічну нішу, однак сприймаються саме як патогени [94, 135].

Сьогодні *E. coli* визнається як один із найпоширеніших умовно-патогенних мікроорганізмів, здатний викликати широкий спектр захворювань: інфекції сечовивідних шляхів, енцефаліти, ентерити, неонатальні менінгіти, сепсис, післяопераційні ускладнення, перитоніти, холецистити, ендокардити,

неврити, пневмонію, отити, кон'юнктивіти, а також ураження шлунково-кишкового тракту, пов'язані з ентеротоксигенними або ентерогеморагічними штамами [23, 83, 129].

Ешерихіоз – термін, що давно закріпився у ветеринарній та медичній літературі, охоплює цілу групу захворювань різної локалізації, спричинених патогенними штамами *E. coli* [11]. Незважаючи на розмаїття патотипів кишкової палички, діагностика та профілактика інфекцій, спричинених *E. coli*, часто ускладнюються як через широку варіабельність антигенного складу, так і через розповсюдженість стійкості до антибіотиків [31, 117, 128].

У ветеринарній практиці численні спалахи ентеротоксигенного ешерихіозу зафіксовані серед молодняка свиней, телят, ягнят і птахів у різних країнах світу, включаючи Україну. Так, типові клінічні випадки у поросят, з характерною діареєю, зневодненням, летальністю та виділенням ентеротоксигенних штамів *E. coli* у посмертному матеріалі, описані А. Lurri [101]. Авторка вказує на те, що у свиней ентеротоксигенна кишкова паличка викликає такі захворювання, як ентеротоксигенний ешерихіоз, що проявляється діареєю у новонароджених та набряковою хворобою у поросят після відлучення. Обидві інфекції призводять до значних економічних втрат через високу смертність, зниження приросту маси та витрати на лікування.

У телят і ягнят ентеропатогенні кишкові палички викликають колібактеріоз і часто виникають у господарствах із низькою санітарною культурою виробництва [12].

У собак та котів *E. coli* може викликати інфекції сечовивідних шляхів, гастроентерити та сепсис, особливо в ослаблених тварин [43].

Таким чином, *E. coli* є важливим збудником різних форм інфекцій у багатьох видів сільськогосподарських, домашніх і диких тварин. Інфекційний процес за коліінфекцій у тварин не вивчений. У ньому, як і у вивченні екології патогенних штамів кишкової палички є багато прогалин. Це потребує

додаткових скринінгових досліджень, постійного моніторингу, а це, в свою чергу, розробки ефективних експрес-методів діагностики.

1.2. Загальна характеристика представників родини *Escherichiaceae*

1.2.1. Таксономічне положення бактерій роду *Escherichia*

Згідно з визначником бактерій Bergey, *Escherichia coli* належить до царства *Pseudomonadota*, класу *Gammaproteobacteria*, порядку *Enterobacteriales*, родини *Enterobacteriaceae* та роду *Escherichia*. Кишкова паличка є типовим представником роду *Escherichia* [87].

Геном *E. coli* демонструє значну різноманітність – лише близько 20% генів є спільними для всіх штамів. Це відображає адаптацію *E. coli* до різних екологічних ніш, включаючи кишечник тварин, ґрунт та воду [44].

Інші роди родини, зокрема *Shigella*, *Franconibacter* та *Gibbsiella*, демонструють деякі подібності, але також і мають важливі відмінності.

Shigella spp. дуже близькі генетично до *E. coli*, однак вони нерухливі, рідко ферментують лактозу і є облігатними патогенами, що викликають шигельоз. *Franconibacter* і *Gibbsiella* менш вивчені, мають спільні базові морфологічні риси (грамнегативні палички), але мало пов'язані з патогенезом у людини, часто зустрічаються в навколишньому середовищі [105].

Так, *E. coli* вирізняється широким спектром біологічних ролей – від нормальної мікробіоти до важливого патогена, тоді як інші представники родини мають значно вужчий патогенний профіль (*Shigella*) [68, 92].

Оскільки у нормальних умовах більшість штамів кишкової палички (до 90 %) існують як комменсали в кишечнику людини та теплокровних тварин, не завдаючи шкоди організму, а інфекції спричиняють потрапляння деяких штамів за межі кишечника або послаблення імунітету, *E. coli* можна віднести до факультативних симбіонтів [68, 116, 135].

1.2.2. Морфологічні ознаки, тинкторіальні, культуральні, біохімічні властивості та біологічні властивості кишкової палички

Escherichia coli – грамнегативна, факультативно анаеробна, паличкоподібна бактерія, розмірами 1,0–3,0 мкм завдовжки та 0,4–0,7 мкм завширшки. Вона каталазопозитивна, оксидазонегативна, ферментує глюкозу та лактозу з утворенням кислоти та газу, а також продукує індол [63] і орнітиндекарбоксилазу, дає негативні реакції щодо уреазу та цитрату [137]. Більшість штамів не мають справжньої капсули [138], проте по всій поверхні розташовані джгутики (перитрих) та війки [110, 152, 165].

Усі види кишкової палички, за винятком *E. albertii*, рухливі завдяки наявності перитрихіально розташованих джгутиків. Окремі штами можуть бути нерухливими. Крім джгутиків, у деяких штамів *E. coli* виявлені пілі I (загальні) та IV (статеві) типу, які сприяють адгезії до епітеліальних клітин, колонізації та передачі генетичної інформації (плазмідної резистентності) [27].

Деякі штами кишкової палички, особливо ті, які виділені з позакишкових інфекцій у людей, виробляють позаклітинний білок гемолізін. Гемолізін є одним із небагатьох білків, які транспортуються через обидві мембрани клітин *E. coli*. Білки, які знаходяться в навколишньому середовищі зростаючої культури *E. coli*, часто вивільняються з периплазми шляхом часткового лізису клітин і, отже, стають позаклітинними лише в старих культурах. Гемолізін виділяється в навколишнє середовище переважно в логарифмічній фазі росту культури [159].

E. coli невибаглива до умов культивування, може рости на простих поживних середовищах. У рідких середовищах росте дифузно, може давати осад, плівку чи кільце на поверхні [95].

На твердих середовищах виростає у вигляді гладеньких, сірувато-білих колоній діаметром 2–3 мм середнього розміру, вологих та блискучих, круглих з рівними краями або плоских, сухих, зі хвилястими краями, через 18–24 год.

інкубації за температури 35–37°C. На середовищах з лактозою (наприклад Ендо або МакКонкі) утворює червоні колонії із металічним блиском або темним центром завдяки ферментації лактози, що є однією з найважливіших ідентифікаційних ознак. На середовищі Левіна *E. coli* утворює темно-фіолетові до чорного кольору колонії із зеленуватим металічним блиском; на Плоскірева – колонії мають злегка жовтуватий відтінок [16].

E. coli здатна утворювати як чітко окреслену полісахаридну капсулу (К-антигени), так і менш структурований екзополісахаридний мукоїдний шар. Так, багато штамів продукують К-антигени, які формують гідратовану капсулу навколо клітини. Інші, зазвичай коменсальні, штами не мають яскраво вираженої капсули, але виділяють слизовий екзополісахарид – зокрема коланову кислоту (colanic acid) [118, 138]. Наприклад, кишкова паличка K-12 практично не формує видимої капсули, тоді як патогенні штами (зокрема штам K1) мають товсту капсулу, що щільно огортає клітину, створюючи суцільний гідратований шар товщиною $\approx 200\text{--}300$ нм [159]. Капсули 1-ої групи – це аніонні гетерополісахариди з гексуроновими кислотами, що мають залишки глюкози та/або галактози і часто містять побічні О-ацетильні чи піруватні модифікації [118].

E. coli продукує два типи бактеріоцинів – коліцини та мікроцини. Коліцини – білки великої молекулярної маси, які кодуються плазмідами і синтезуються за стресових умов. Дія коліцинів спрямована здебільшого на інші штами *E. coli*, а також на близькоспоріднені ентеробактерії, зокрема *Shigella* [135]. Мікроцини – малі пептидні токсини, які кодуються як плазмідами, так і хромосомними генами і мають вузький спектр дії проти деяких грамнегативних бактерій [42, 118].

E. coli та інші види кишкової палички проявляють низьку протеолітичну активність, зокрема, не засвоюють цитратних солей, не утворюють сірководень та уреазу, але окремі види утворюють індол, володіють лізин- та орнітиндекарбоксилазою (табл. 1.1).

Таблиця 1.1.

Біохімічні властивості *E. coli* та інших видів роду *Escherichia*

Вид	Лак-тоза	Сахароза	Сорбітол	Ін-дол	Газ (глюкоза)	Цитрат	H ₂ S	Уреаза	Лізин-декарбоксилаза	Орнітин-декарб.	Оксидаза
<i>E. coli</i>	+	—	+	+	+	—	—	—	+	+	—
<i>E. albertii</i>	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—
<i>E. blattae</i>	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—
<i>E. fergusonii</i>	—	—	—	+	+	—	—	—	+	+	—
<i>E. hermannii</i>	±	±	—	+	+	—	—	—	—	+	—
<i>E. vulneris</i>	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—

Цукролітичні властивості теж не вирізняються високою активністю, бо із основних цукрів, що найчастіше використовуються у кольоровому ряді, глюкоза гідролізується до кислоти і газу усіма видами роду *Escherichia*, тоді як *E. coli*, крім цього, здатна утилізувати сорбітол та лактозу. Здатність розщеплювати лактозу до кислоти і газу є диференційною ознакою бактерій групи кишкової палички [4, 27].

1.2.3. Антигенні властивості та фактори патогенності *E. coli*

Антигенна структура *E. coli* є досить складною. Зокрема, структури клітинної стінки *E. coli* включають такі антигени:

- О-антигени — термостабільні полімерні олігосахариди зовнішнього шару LPS (ліпополісахариду) [144]. Кожен О-антиген складається з повторюваних олігосахаридних блоків (2–7 залишків) різної вуглеводної сполуки. У *E. coli* описано понад 180 О-серогруп (система Кауфмана), які є основою серологічної ідентифікації штамів [160].

- Н-антигени – термолабільні білки, що формують бактеріальні джгутики. У *E. coli* описано близько 53 варіантів Н-антигену [160]. Комбінація О-антигену з Н-антигеном дозволяє ідентифікувати ізоляти до серовару.

- К-антигени – капсульні полісахариди, що покривають зовнішню мембрану. У *E. coli* відомо понад 80 різних капсульних типів (К-антигенів). Вони часто нагадують полісахариди хазяїна (наприклад полісаліцилова кислота K1) [160].

Ешерихіозна інфекція характеризується поліморфізмом клінічної картини захворювання, що може бути зв'язано не лише з епідемічною ситуацією, віком і станом інфікованого організму, але й біологічними властивостями самого збудника [18, 60, 117]. Особливе місце у цьому займають генетичні позахромосомні детермінанти – плазмідні, які досить легко передаються між різновидами ешерихій та інших ентеробактерій. Так, в одному виді виникають штами від повністю авірулентних до гібридних високо патогенних [150]. Патогенність визначається трьома ключовими властивостями: заразність – здатність викликати захворювання у природних умовах; інвазивність – здатність розмножуватись в організмі, долаючи його захисні властивості; токсигенність – здатність втручатися в метаболічні функції хазяїна, порушуючи його гомеостаз [29, 141].

До факторів патогенності *E. coli* відносять:

1. Адгезини, які визначають першочерговий контакт з клітинами хазяїна, що необхідно для колонізації. Прикріплення дозволяє бактеріям опиратися фізіологічному очищенню і створює умови для локального накопичення і проникнення. До них відносять:

- Фімбрії типу 1 – зв'язують манозні рецептори на епітеліоцитах, сприяють колонізації сечовивідних шляхів (УПКП – уропатогенні кишкові палички) і кишечника (деякі ЕТЕС – ентеротоксигенні *E. coli*).

- Р-фібрії – сполучаються з рецепторами на клітинах ниркового епітелію; їх наявність у УПКП асоціюється з висхідним циститом чи пієлонефритом.

- Комплекси пілі, що визначають прилипання до епітелію тонкої кишки. Вони представляють перший клас структур, залучених у зв'язування бактерій із рецепторами клітин хазяїна. Основа цих структур прикріплена до зовнішньої бактеріальної мембрани, тоді як кінчик зазвичай є фактором приєднання, що надає зв'язувальну специфічність цих структур. Наприклад, УПКП (уропатогенних кишкових паличок), що колонізують сечовивідні шляхи та беруть участь у інфекціях нирок, мають на своїй поверхні пілі, асоційовані з пієлонефритом.

- Інтимін – білок адгезії у ентерпатогенних *E. coli* (ЕРЕС) та ентерогеморагічних *E. coli* (ЕНЕС).

- Пілі типу IV – прикріплюють ЕРЕС на поверхні ентероцитів.

- Секреторні білки.

- Ферменти інвазії та білки, що руйнують тканини або забезпечують проникнення в клітину. Для *E. coli* інвазивність найчастіше забезпечується білками, які перенесяться плазмідами Т3SS та рецептором Tіg. Деякі білки інвазивності можуть пригнічувати клітинні процеси чи імунітет, полегшуючи проникнення.

2. Ендо- та екзотоксини, що безпосередньо ушкоджують клітини і тканини хазяїна:

- Ендотоксин (ліпополісахарид О-антигену) – компоненти зовнішньої мембрани, що викликають запальну реакцію, лихоманку і шок при потраплянні в кров.

- Ентеротоксини ЕТЕС: термолабільні (LT) і термостабільні (ST) – спричиняють секрецію води та електролітів у просвіт кишки і профузну діарею. Здебільшого, кодуються плазмідами.

- Шига-подібні токсини (Stx1, Stx2) у EHEC та STEC – спричиняють геморагічний коліт і гемолітико-уремічний синдром (HUS).
- Гемолізін α – цитотоксин UPEC, утворює пори в мембранах еритроцитів і клітин, викликаючи їх руйнування.
- Цитотоксин некротизуючий фактор 1 (CNF1) у UPEC – сприяє апоптозу клітин епітелію.
- EspC (EPEC) – викликає некроз ентероцитів.

3. Фактори виживання, що дозволяють *E. coli* довше утримуватися в організмі хазяїна:

- Капсульний полісахарид (К-антиген) – у деяких штамів утворює зовнішню капсулу. Капсула суттєво зменшує опсонізацію і активацію комплементу, пригнічуючи фагоцитоз.
- Сидерофори – хелатори заліза, низькомолекулярні полідентатні ліганди забезпечують захоплення заліза з навколишніх сполук, утворюючи з ним хелатні комплекси.
- Гени резистентності до комплементу (*traT*, *iss*) – кодують білки зовнішньої мембрани, що захищають бактерії від руйнування мембрано-атакуючим комплексом комплементу крові. Такі гени часто кодуються плазмідами UPEC і EхPEC.
- LPS-структури (О-антиген) – одночасно є фактором виживання: широкі О-полісахаридні ланцюги перешкоджають контакту мембрано-атакуючого комплексу комплементу з мембраною.
- Капсула є антифагоцитарним фактором: штами з капсулою демонструють знижену опсонізацію через малу активацію комплементу.
- Утворення біоплівки.

Наявність в *E. coli* широкого комплексу факторів патогенності, тривала коеволюція кишкової палички із організмами теплокровних тварин, висока пристосувальна здатність *E. coli* до колонізації різних біотопів організму тварин і людини, в процесі тривалої еволюції симбіотичні взаємини часто

переходили в антагоністичні, завдяки чому низка серологічних варіантів *E. coli* набула властивостей завершеного патогена. Зважаючи на переважаючу експресію тих чи інших факторів патогенності в кожному конкретному випадку клінічного прояву ешерихіозу описані на теперішній час патотипи *E. coli* поділені таким чином [44, 88, 156]:

1) ETEC (enterotoxigenic *Escherichia coli*) – колонізують тонку кишку і виділяють ентеротоксини. Характерні ETEC-фактори включають множинні колонізаційні фімбрії та адгезини і токсини LT (термолабільний) та ST (термостабільний). Ці штами викликають водянисту діарею, особливо у мандрівників та дітей у країнах, що розвиваються [41].

2) EHEC/STEC (enterohemorrhagic *Escherichia coli* / Shiga-toxin producing *Escherichia coli*) – викликають геморагічний коліт і HUS. Основний вірулентний фактор – шига-подібні токсини (Stx1, Stx2). Також EHEC мають систему А/Е-патогенності (інтимін/Tir, T3SS) для колонізації кишкового епітелію і можуть продукувати гемолізін. Відомі серовари – O157:H7, O104:H4 (гібрид EHEC/EAEC) [111].

3) EPEC (enteropathogenic *Escherichia coli*) – діарейна інфекція, особливо у немовлят. Єдиний їх екзотоксин – протеаза EspC (SPATE). Патогенез EPEC полягає в прикріпленні до ентероцитів і руйнуванні мікроворсинок, що веде до швидкої водянистої діареї без крові. Після початкового контакту з кишковими ентероцитами, частково через полюс формування пучка, EPEC швидко викликає виведення мікроворсинок та індукує локалізовану полімеризацію актину, що призводить до утворення п'єдесталів під бактеріями, до яких вони прикріплюються. EPEC вважається неінвазивним патогеном і покладається на систему секреції третього типу (T3SS), для доставки ефекторних білків безпосередньо в клітини хазяїна, які підривають безліч клітинних функцій хазяїна, що в кінцевому підсумку призводить до захворювання [57, 80, 88].

4) AIEC (Adherent-Invasive *E. coli*) – асоційовані з хронічними запальними захворюваннями кишечника, такими як хвороба Крона. Проникають у клітини епітелію. Властивістю AIEC є індукція аутофагічної загибелі клітин нейтрофілів. У присутності антибіотиків AIEC активують вироблення АФК нейтрофілів і сприяють запаленню кишечника. Патовари кишкової палички, ймовірно, проникають у слизовий шар, сприяючи розкладанню муцину за допомогою протеаз. Секреція захисних протимікробних пептидів хазяїна також може бути змінена деякими ізолятами AIEC [29, 30].

5) ExPEC (Extraintestinal Pathogenic *E. coli*) – група факультативних патогенів [56, 84], включає такі патотипи:

- UPEC (Uropathogenic *E. coli*) – збудники інфекцій сечовивідних шляхів. UPEC мають специфічні адгезини для прикріплення до уротелію. Вони також часто продукують HlyA, CNF1 та інші цитотоксини для руйнування клітин сечовивідних шляхів. Можуть спричиняти цистит, пієлонефрит і сепсис [154].

- NMEC (Neonatal meningitis-causing *Escherichia coli*) – викликає менінгіт у новонароджених. NMEC мають здатність проникати через гемато-енцефалічний бар'єр і спричиняти запалення оболонок головного мозку. Одним з основних факторів вірулентності є капсульний антиген K1, який допомагає бактеріям уникати фагоцитозу та захищає від дії імунної системи [38].

- SEPEC (Sepsis associated *E. coli*) – викликають сепсис у пацієнтів з ослабленим імунітетом, літніх людей, пацієнтів після операцій або з важкими супутніми захворюваннями. Можуть проникати в кровообіг, викликаючи запалення та розповсюдження інфекції по всьому організму. Порушують функцію ендотелію судин і викликають судинну дисфункцію [108].

- APEC (Avian pathogenic *E. coli*) – викликають інфекції у птахів, спричиняючи важкі хвороби, такі як перитоніт, сепсис, а також респіраторні захворювання [153].

Аналіз літературних даних свідчить про те, що *E. coli* володіє багатовекторним арсеналом факторів патогенності, а тому може бути віднесена до переліку завершених патогенів. Розробка експрес-методів виявлення головних факторів патогенності, що локалізуються на клітинній оболонці *E. coli*, має не лише наукове, але й прикладне значення, бо вони можуть лягти в основу скринінгових досліджень об'єктів довкілля і тим самим розкрити досі невідомі екологічні ніші циркуляції патогенних штамів кишкової палички.

1.2.4. Стійкість до дії фізичних, хімічних та біологічних факторів. Антибіотикорезистентність *E. coli*

Кишкова паличка здатна довго виживати у водних середовищах, особливо за низьких температур. Наприклад, 4–10 °С бактерія витримує декілька тижнів, тоді як при ~20 °С тривалість виживання скорочується до кількох діб. Життєздатність *E. coli* у водоймах залежить від температури, рН та присутності органіки [146].

У сухому кормі та подібних до нього матеріалах *E. coli* витримує декілька тижнів за наявності білоквмісних компонентів. У силосі бактерія здатна виживати до 7 тижнів.

На шкірних покривах людини за кімнатної температури потрібно близько 6 хв для інактивації 50 % кишкової палички.

На пористих матеріалах втрата життєздатності настає за кілька діб. Наприклад, на бавовняних тканинах *E. coli* гине за ~1–2 доби, а на синтетичному поліестері – до ~9 діб.

На непористому пластику (поліетилен, поліпропілен) бактерії витримують від кількох діб до декількох тижнів. Так, *E. coli* залишалася життєздатною понад 25 діб на пластику за низьких температур.

На сталі та інших металічних поверхнях *E. coli* виживає значно довше. При 4 °С бактерії зберігаються навіть до 60 діб на нержавійці, а за кімнатної температури – навіть до ~28 діб за даними Wilks et al. [164].

E. coli відносно резистентна до висушування, але значна частина клітин гине без вологи. В експериментальних умовах кишкові палички можуть виживати на сухих поверхнях від кількох тижнів до кількох місяців.

E. coli є мезофільною бактерією (оптимум ~37 °С) і погано витримує високі температури. Нагрівання до 70 °С і вище повністю знешкоджує її. При 60 °С більшість клітин втрачають життєздатність за кілька хвилин, однак існують термостійкі штами, які виживають понад 10 хв. На практиці кип'ятіння миттєво вбиває ешерихій, а прогрівання до 70 °С протягом 5 хв дає гарантію стерильності [106].

Ультрафіолет дуже ефективно інактивує кишкову паличку, ушкоджуючи ДНК бактерій. Навіть короткі опромінення дають значне знищення. Наприклад, при інтенсивності ~1700 $\mu\text{Вт}/\text{см}^2$ (лампа низького тиску 254 нм) 0,23 с вистачає для редукції чисельності *E. coli* на 0,6 log (~73% клітин гине), а 5,6 с – майже на 3 log (~99,9% гинуть). Збільшення дози (інтенсивності або тривалості) викликає практично повне знешкодження. Загалом, *E. coli* дуже чутлива до УФ-опромінення і зазвичай гине протягом секунд під дією стерилізуючого УФ-С світла [151].

Також *E. coli* вразлива до більшості дезінфікуючих засобів. Так, розчин формаліну руйнує білки й нуклеїнові кислоти; хлорні сполуки (натрій гіпохлорит, хлорамін) у концентрації 0,5 % NaOCl повністю знищує кишкову паличку за декілька хвилин [150]. Етанол та ізопропанол у концентрації 60–80 % руйнують мембрани бактерій і ті гинуть майже одразу; 3 %-ний перекис водню вимагає декількох хвилин для повної інактивації бактерій.

E. coli, як основний коменсал товстого відділу кишківника людини, зазнає частого впливу антибіотиків внаслідок лікування або через їх сліди в їжі, і, як наслідок, коменсальні популяції накопичують гени стійкості

(плазмідні β -лактамази, модифікуючі ферменти аміноглікозидів, мутації в QRDR) та передають їх горизонтальним перенесенням [50, 109]. Ця здатність у здорових носіїв ускладнює терапію та сприяє рецидивам інфекцій, що підкреслює необхідність контрольованого застосування препаратів і моніторингу резистентності мікрофлори [73, 122, 142].

Соціально-економічні умови, такі як доступність антибіотиків без рецепта та недостатній контроль інфекцій у медичних закладах, значною мірою сприяють поширенню антибіотикорезистентності серед штамів *E. coli*.

Згідно з останніми дослідженнями, рівень резистентності ешерихій до β -лактамних антибіотиків, карбапенемів та колістину суттєво зріс у різних регіонах світу, особливо в Африці та Азії [66, 142]. Механізми резистентності, такі як продукування β -лактамаз розширеного спектру (ESBL) та метало- β -лактамаз (NDM), а також наявність плазмідних генів (наприклад, *mcr-1*), ускладнюють терапію та сприяють горизонтальному переносу резистентності між бактеріями [33, 68]. ESBL-продукуючі штами зазвичай резистентні до широкого спектру антибіотиків (пеніциліни, цефалоспорини 3-го покоління, фторхінолони, аміноглікозиди тощо), хоча залишаються чутливими до карбапенемів у більшості випадків [35, 54, 140].

Таким чином, кишкова паличка, володіючи низкою факторів патогенності, проявляючи високу стійкість до дії несприятливих факторів зовнішнього середовища та антибіотикорезистентність, веде себе як доконаний патоген, а тому становить загрозу здоров'ю тварин та людей.

1.3. Епідеміологія та епізоотологія ешерихіозів

Згідно з даними ВООЗ та наукових і лікувально-діагностичних установ, ешерихіози поширені на всіх континентах світу, де мешкають люди [69, 71].

Ентеропатогенні кишкові палички здатні інфікувати представників усіх вікових груп населення, але найвищий рівень захворюваності спостерігається

серед дітей раннього віку [48, 107, 110]. Особливо уразливі особи з ослабленим імунітетом (немовлята, літні люди, хворі з супутніми захворюваннями) та мандрівники в країни з низьким рівнем санітарії [66]. Так, навіть у розвинених країнах бактеріємія ешерихіозної природи становить 50–90 випадків на 100 000 населення, летальність за колісепсису сягає 8,9–11%. Не менш напруженою є епідемічна ситуація щодо HUS, колієнтеритів, коліменінгітів та інших нозологічних одиниць ешерихіозної природи. Це є свідченням того, що епідемічна ситуація щодо ешерихіозів населення у країнах світу є складною, має свої епідеміологічні особливості і потребує детального вивчення [49, 61, 108].

В Україні епідемічна ситуація щодо ешерихіозів недостатньо вивчена і слабо контрольована, а тому вивчення особливостей інфекційного та епідемічного процесів за ешерихіозів населення є актуальною темою наукових пошуків [133].

Епізоотична ситуація щодо ешерихіозів у країнах світу та в Україні, зокрема, характеризується нерівномірною просторовою напруженістю [1, 8]. Вивчення особливостей епізоотичного процесу за ешерихіозів продуктивних і домашніх тварин є ситуаційним, що радше пов'язане із спалахами інфекції у тих чи інших господарствах, аніж цілеспрямованим науково-обґрунтованим вивченням його основних рушійних сил. Дослідження останніх років вказують на тісний зв'язок між основними ланками епідемічного та епізоотичного процесів ешерихіозів людини і тварин [41, 68, 132]. Більше того, відсутність клінічних форм перебігу інфекційного процесу ешерихіозу у продуктивних тварин значно підвищує біоризики інфікування людей патогенними штамми *E. coli* і, особливо, імунодепресивної категорії населення.

Тому вивчення ролі продуктивних тварин (велика і дрібна рогата худоба, свині, птиця) як природних резервуарів збудника ешерихіозу людини є дуже важливим напрямком наукових пошуків. Особливе місце у цих дослідження

відводиться розробці експрес-методів лабораторної індикації та ідентифікації ентеропатогенних штамів кишкової палички.

1.4. Діагностика ешерихіозів

1.4.1. Методи прямої індикації та ідентифікації збудника ешерихіозу

Пряма індикація та ідентифікація кишкової палички ґрунтується на комплексі бактеріологічних, серологічних та молекулярно-генетичних методів. Сучасні протоколи включають як класичні мікробіологічні техніки, так і високочутливі молекулярні інструменти [41, 92, 110].

Для виділення та ідентифікації *Escherichia coli* використовують селективно-диференційні середовища з індикаторами ферментації лактози, такі як Ендо, Левіна, МакКонкі та ін. Форма та вигляд колоній теж мають певне інформативне значення у системі бактеріологічної діагностики. Для виділення ентерогеморагічних штамів (наприклад, O157:H7) застосовують агар МакКонкі з сорбітолом (Sorbitol-MacConkey, SMAC): патогенні штами *E. coli* O157 не ферментують сорбітол, тому такі колонії на SMAC залишаються безбарвними [92, 132]. Гемолітичність ізолятів можна виявити посівом на кров'яний м'ясо-пептонний агар (КМПА).

Морфологічна ідентифікація включає стандартні тести: фарбування за Грамом, оцінка форми, розміру, типу ділення, рухливості.

Стандартні біохімічні дослідження включають тести на каталазу, оксидазу, цукролітичні властивості (розщеплення глюкози та лактози), здатність утворювати індол та сірководень, засвоювати цитратно-амонійні солі, розріджувати желатин, давати позитивну реакцію Фогес-Проскауера та ін., що у рутинних діагностичних установах має назву кольоровий або строкатий ряд.

Для комплексної біохімічної ідентифікації зарубіжними фірмами розроблені спеціальні біохімічні тести, зокрема API-тест (Чехія), Rapid Strep, Minibact [112].

Імунологічні тести застосовують для виявлення антигенів чи токсинів *E. coli*, а також специфічних ешерихіозних антитіл. Імуноферментний аналіз (ІФА) використовується, наприклад, для детекції шигатоксинів Stx1 і Stx2 в калових зразках чи змивах.

Реакція аглютинації дозволяє швидко скринінгувати певні серогрупи *E. coli*. Наприклад, комерційні латексні тести з наночастинками, покритими антитілами до О-антигенів демонструють високу чутливість та специфічність для діагностики *E. coli* O157:H7 [14].

Whitaker та ін. (1958) вперше застосували метод флуоресцентних антитіл (МФА) для дослідження ентеропатогенної *E. coli* серотипу 0127:B8 [161]. В основному для цих досліджень використовувалися ректальні мазки, хоча в окремих випадках також аналізувалися зразки калу або чисті культури. Р. Cohen et al. з'ясували, що підрощування зразків фекалій у МПБ збільшує ймовірність виявлення мікроорганізмів за допомогою МФА [86]. Для отримання результатів звичайними культуральними методами зазвичай було необхідно мінімум 4 дні. Виявити більше, ніж один серотип в одному зразку за допомогою МФА вдавалося дуже рідко [104].

Полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) дозволяє точно ідентифікувати *E. coli* на рівні ДНК та визначити наявність генів вірулентності. Зазвичай цільові праймери адаптовані до генів, що кодують фактори патогенності. Наприклад для діагностики шига-токсигенної *E. coli* використовують ПЛР на гени stx1, stx2. Сучасні підходи включають кількісну ПЛР для забезпечення більшої чутливості та динамічного моніторингу патогенів [77].

Метод ДНК-гібридизації дає можливість виявляти від 10 до 100 копій ДНК у зразку, що дозволяє ідентифікувати бактерії безпосередньо в клінічних зразках [28].

Проте, діагностичні лабораторії Держпродспоживслужби, обласних клінічних лікарень, служби охорони здоров'я (колишні санітарно-епідеміологічні станції) та ветеринарних клінік не мають на озброєнні такого дороговартісного обладнання, а тому рутинні скринінгові чи вимушені дослідження з метою встановлення навіть родової, а тим паче видової приналежності ізолятів із експресією на їх поверхні ферментів та факторів ентеропатогенності чи гемолітичності, не проводилися, не проводяться і мабуть у найближчій часі проводитися не будуть. Для перерахованих вище діагностичних установ найкращим підходом для виявлення ентеропатогенності ізолятів кишкової палички є методи, які базуються на застосуванні експрес-методів, до яких відноситься прямий варіант МФА.

1.4.2. Метод епідеміологічного та епізоотологічного аналізу

Сучасні методи епідеміологічного та епізоотологічного аналізу базуються на системному підході і поєднують в собі просторово-часові характеристики епідемічного та епізоотичного процесів, еколого-географічні дослідження біотичних та абіотичних джерел збудників ешерихіозів, молекулярно-генетичні методи детекції специфічних генів збудника, оцінку його антибіотикочутливості, аналіз шляхів та факторів передачі збудника інфекції, критерії популяційної сприйнятливості населення та поголів'я продуктивних тварин до патогенних штамів *E. coli*, встановлення переважаючого впливу тих чи інших соціально-економічних, природно-екологічних факторів на розвиток інфекційного процесу на індивідуальному рівні взаємодії збудника інфекції із патогеном, статистичне моделювання поширення інфекції та оцінку ефективності профілактичних заходів [136, 145].

Первинний етап епідеміологічного аналізу передбачає ретроспективну оцінку захворюваності з урахуванням географічного розподілу, сезонності та демографічних характеристик. Класичним методом є моніторинг офіційної

статистики з подальшою нормалізацією даних на 100 тис. населення [18, 78]. Регресійні моделі з урахуванням кліматичних факторів (температура, вологість) дозволяють прогнозувати сезонні піки захворюваності.

Для проведення епізоотологічного аналізу спалахів ешерихіозів серед тварин проводять клініко-епізоотологічне обстеження поголів'я господарств молочного чи м'ясного напрямків. Для цього існують затверджені органами державного ветеринарного контролю стандартні протоколи обстеження, що включають аналіз показників, які характеризують умови утримання тварин – середня площа приміщення на одну тварину, стан вентиляції і освітлення, мікробне забруднення повітря та підстилки, ефективність профілактичних та вимушених дезінфекційних заходів, часової та просторової динаміки випадків клінічного перебігу захворювання, оцінки ефективності лікувально-профілактичних заходів тощо. Важливим пунктом епізоотологічного аналізу є оцінка параметрів повноцінності та якості кормової бази, а отже годівлі тварин, що має безпосередній вплив на стан природної опірності організму тварин. Специфічна профілактика колібактеріозів тварин проводиться шляхом застосування комерційних вакцин зарубіжного виробництва, які зареєстровані в Україні або аутогенних вакцин, які виготовленні із місцевих штамів *E. coli*, причетних до спалаху колібактеріозу серед молодняку [32]. У зв'язку з тим, що на колібактеріоз хворіють телята перших двох тижнів після народження, то для його активної профілактики щеплюють корів в останній період тільності. Таким чином, захист телят відбувається за рахунок молозивних антитіл.

Проте, як свідчать дослідження низки науковців, продукти харчування, виготовлені із яловичини, нерідко є причиною харчових токсикоінфекцій, збудником яких є ентеропатогенні штами *E. coli* [90, 126]. Зрозуміло, що яловичину для харчових цілей отримують від забитої здорової великої рогатої худоби. Отже, здорова худоба є бактеріоносієм патогенної кишкової палички. Логічно постає питання місця локалізації *E. coli* в організмі забійних тварин і

шляхів потрапляння у м'ясотушу: з кишечника тварини за умови порушення технології оброки туш чи вона потрапляє в тканини м'ясотуші до забою. Поки що на ці нериторичні питання у науковців немає відповіді. Можливо, застосування прямого варіанту МФА як експрес-методу виявлення та ідентифікації ентеропатогенних кишкових паличок дозволить з'ясувати відповідь на це непросте питання і, таким чином, буде ще одним етапом у зменшенні біоризиків виникнення харчових токсикоінфекцій, збудником яких є ентеропатогенні штами *E. coli*.

У свиней ешерихіоз проявляється переважно у відлучених поросят 2–3-місячного віку в ентеротоксемічній формі і має назву набрякова хвороба. Хвороба протікає блискавично з вираженими симптомами токсикозу, гастроентериту та ураженнями центральної нервової системи, супроводжується набряками. Це факторна хвороба, що виникає в результаті порушення санітарних норм при відлученні поросят від свиноматки. Збудником інфекції є бета-гемолітична кишкова паличка [124, 155].

В усіх випадках колібактеріозу у тварин діагноз повинен бути підтверджений бактеріологічно шляхом виділення та ідентифікації ізолятів *E. coli* із обов'язковим визначенням чутливості до антибіотиків та встановленням ентеропатогенності [12, 101].

Ентеропатогенність встановлюють шляхом:

- серологічної типізації в РА на склі із типоспецифічними аглютинуючими О-, Н- і К-аглютинуючими колібактеріозними сироватками;
- виявленням β -гемолітичної активності ізолятів *E. coli*;
- внутрішньочеревним інфікуванням трьох білих мишей живою масою 16 г суспензією мікробних клітин ізолятів *E. coli* в дозі 250 тис. на одну тварину. У випадку загибелі хоч однієї тварини ізолят вважається ентеропатогенним і в господарстві вживають відповідних заходів, як і у випадку виявлення збудника будь-якого іншого небезпечного інфекційного захворювання.

Скринінгове дослідження поголів'я поросят перед відлучкою з метою виявлення в зразках фекалій ентеропатогенних штамів *E. coli*, а тим паче із кількісною оцінкою біоризиків спалаху набрякової хвороби, що ґрунтується на застосуванні МФА в прямому варіанті, мало б велике значення як для профілактики набрякової хвороби, так і для економіки господарства, але найважливіше, що на основі таких результатів можна усунути біоризики інфікування населення через продукти харчування, виготовлені зі свинини.

Ретроспективні методи діагностики ешерихіозів не знайшли застосування ні в діагностиці цієї хвороби, ні в скринінгових дослідженнях, спрямованих на відстежування за інфікованістю (бактеріоносійством) популяцій населення чи продуктивних груп тварин ентеропатогенними типами *E. coli*.

1.5. Узагальнення результатів літературного огляду

Біологічні властивості, особливості метаболізму, екологія кишкової палички, епідеміологічні та епізоотологічні дані дають підставу вважати, що фактори довкілля та організм людини і тварин відіграють важливу і в той же час неоднозначну роль у прояві її синергічних та паразитичних властивостей. Адже за певних, до кінця ще нез'ясованих умов, *E. coli* із синергіста перетворюється у завершеного патогена і, таким чином, виступає як збудник цілої низки нозологічних форм як у людини, так і в тварин. Останні в епідемічному ланцюгу ешерихіозів людини виступають як природне джерело і природний резервуар патогенних штамів кишкової палички і, в першу чергу, кишкових форм інфекцій, не проявляючи при цьому ознак інфекційного процесу. Таке бактеріоносійство становить серйозні біоризики для здоров'я населення.

З іншого боку, літературні дані свідчать про зростання ролі *E. coli* як збудника позакишкових нозокоміальних інфекцій. При цьому більшість

умовно-патогенних штамів здатні продукувати β -лактамази розширеного спектру (ESBL), що ускладнює лікування опортуністичних інфекцій.

З цих міркувань розробка і впровадження у практику діагностичних лабораторій усіх напрямків і підпорядкувань експрес-методів індикації та ідентифікації ентеропатогенних гемолітичних штамів кишкової палички є важливим завданням та актуальною темою наукових розробок. Це дасть можливість завчасно виявляти потенційні біотичні чи абіотичні джерела збудників ентеральних і позаентеральних ешерихіозів та попереджувати виникнення спалахів харчових токсикоінфекцій ешерихіозної природи, своєчасно та правильно призначати лікування та ефективно впливати на епідемічний та епізоотичний процеси за ешерихіозів людей і тварин.

Таким методом є прямий варіант методу флуоресціюючих антитіл, який поєднує в собі об'єктивність мікроскопічного методу та високу специфічність імунологічного методу, відзначається простотою і швидкістю виконання та, найважливіше, можливістю його проведення у звичайних діагностичних лабораторіях.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Роботу виконували на базі Волинського національного університету імені Лесі Українки, віварію та ізолятора бактеріологічного відділу лабораторії Держпродспоживслужби Волинської області, а також у ТОВ «Городище-2» Луцького району Волинської області у період з 2022 по 2025 роки за схемою представленою в табл. 2.1.

Таблиця 2.1.

Етапи виконання дисертаційної роботи

Етапи	Виконані роботи
I етап	Робота над літературою з обраної теми дисертації. Вивчення методів дослідження. Розробка мети, завдань та плану дисертаційної роботи.
II етап	Вивчення епідемічної ситуації щодо ешерихіозів людини в країнах світу та в Україні.
III етап	Вивчення епізоотичної ситуації щодо ешерихіозів тварин в країнах світу та в Україні.
IV етап	Підбір виробничих тест-штамів <i>E. coli</i> для виготовлення вакцинних препаратів за тинкторіально-морфологічними, культурально-біохімічними та біологічними властивостями.
V етап	Відпрацювання оптимальних умов культивування тест-штаму <i>E. coli</i> з метою максимального накопичення мікробної маси та збереження морфологічної структури бактеріальних клітин як основних антигенних детермінант.
VI етап	Виготовлення 2 серій вакцинних препаратів із відібраного тест-штаму <i>E. coli</i> .
VII етап	Вивчення антигенності вакцинних препаратів у виробничих умовах на різних видах тварин з метою підбору тварин-донорів та пошуку оптимальних схем їх імунізації з метою отримання високо активних імунних ешерихіозних сироваток.
VIII етап	Вивчення активності та досягнення високої ОН-антигенної специфічності імунних ешерихіозних сироваток.
IX етап	Виготовлення мічених ешерихіозних глобулінів та їх апробація у лабораторних умовах на активність та специфічність.
X етап	Застосування розроблених мічених ешерихіозних глобулінів у практичних умовах діагностичної лабораторії з метою виявлення та ідентифікації ентеропатогенних β -гемолітичних штамів <i>E. coli</i> .
XI етап	Написання і публікація наукових статей, тез для участі в роботі науково-практичних конференцій з метою ознайомлення науковців, практичних працівників гуманної і ветеринарної медицини та працівників діагностичних лабораторій із результатами нашої роботи.
XII етап	За результатами виконаної дослідницької роботи та аналізу опрацьованої наукової літератури написання дисертації

У роботі були використані такі матеріали:

- 4 штами ентеротоксигенної β -гемолітичної *E. coli* і по одному штаму *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*;
- 2 серії вакцинних препаратів із тест-штаму *E. coli*;
- 12 клінічно здорових бугаїв голштино-фризької породи, віком 6–7 місяців;
- 6 коней безпородних віком $2 \pm 0,5$ роки;
- 6 баранів породи прекос віком $6 \pm 0,5$ місяців;
- 6 кролів породи шиншила віком 6 місяців, масою $3 \pm 0,3$ кг;
- 12 білих мишей живою масою 16 ± 1 г для постановки біопроби з метою визначення ентеропатогенності штамів *E. coli*;
- 6 зразків крові (нестабілізованої та стабілізованої гепарином) від бугаїв, імунізованих вакцинними препаратами для біохімічного, гематологічного та імунологічного дослідження;
- 10 зразків молока корів;
- 10 зразків м'яса яловичини;
- 10 зразків фекалій від телят віком 25 ± 5 днів;
- 10 зразків фекалій від поросят віком 8 ± 1 тиждень;
- середовища для культивування штамів *E. coli* – ТСДБ (триптон-соєвий дріжджовий бульйон), МПБ, МПА, ЗПВ (забуферена пептонна вода);
- диференційно-діагностичні середовища Ендо, Левіна, МакКонкі;
- строкатий ряд для визначення біохімічних властивостей штамів *E. coli*;
- Набір Rapid ID32 – комерційна система для комплексної оцінки біохімічних властивостей культур *E. coli*;
- кров'яний м'ясо-пептонний агар (КМПА) для вивчення гемолітичних властивостей ізолятів *E. coli*;

- формальдегід, аеросил А-300, сефадекс, ФІТЦ (флуоресцеїну ізотіоціанат);
- лабораторні реагенти та прилади для фотоколориметрії, постановки РА, визначення фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу, приготування мазків, фарбування, нефелометрії тощо.

У роботі використано такі методи дослідження:

- метод епідеміологічного та епізоотологічного аналізу [15, 52, 98];
- клінічний, який включав загальний огляд, пальпацію, термометрію та аускультацію [6].
- мікроскопічний [7, 99], що включав у себе:
 - 1) звичайну світлову мікроскопію фіксованих і зафарбованих за Грамом мікропрепаратів;
 - 2) фазово-контрастну мікроскопію живих мікропрепаратів «висяча крапля»;
 - 3) метод флуоресціюючих антитіл у прямому варіанті;
- культуральний метод, з допомогою якого вивчали умови культивування, швидкість та інтенсивність росту, форму, розмір і величину колоній ізолятів кишкової палички на звичайних та диференційно-діагностичних середовищах [16, 45, 99];
- імунологічний метод, що включав реакції аглютинації та прямої імунофлуоресценції, а також визначення фагоцитарної активності і фагоцитарного індексу, бактерицидної і лізоцимної активності сироваток крові тварин-донорів [16, 24];
- біохімічні дослідження [5, 19] проводили з метою:
 - 1) визначення рівня загального білка та білкових фракцій у сироватці крові тварин-донорів;
 - 2) ідентифікації ізолятів кишкової палички за цукролітичними, протеолітичними та окисно-відновними властивостями;

- гематологічні, які включали підрахунок еритроцитів та лейкоцитів і визначення рівня гемоглобіну в крові тварин-донорів [103];
- біологічний метод застосовували для встановлення ентеропатогенності ізолятів кишкової палички [16];
- мікрофотографування проводили на:
 - 1) мікроскопі Primo Star 3 (ZEISS), цифрової камери Axioscam 208 (ZEISS) та спеціалізованого програмного забезпечення Z (ZEISS);
 - 2) люмінесцентному мікроскопі;
- економічні методи в роботі були використані нами з метою визначення економічної ефективності від застосування прямого варіанту методу флуоресціюючих антитіл з метою виявлення та ідентифікації ентеропатогенної β -гемолітичної кишкової палички у порівнянні із іншими мікробіологічними методами [85, 143];
- статистичні методи обробки отриманих результатів [17, 25].

Ідентифікацію культур *E. coli* здійснювали за біохімічними властивостями культур на строкатому ряді та з використанням набору API-тест Rapid ID32.

Цукролітичні властивості *E. coli* досліджували на середовищі Гісса з глюкозою, лактозою, мальтозою, рамнозою, манітом та сахарозою. Для цього вносили по 0,2 см³ досліджуваної культури у дві пробірки з середовищем Гісса, яке містило 0,1% пептону та 0,25% відповідного вуглеводу. В одну з пробірок додатково нашаровували по 0,5 см³ стерильної вазелінової олії для створення анаеробних умов. Інкубацію проводили за температури 37 °C протягом 24–48 годин.

Протеолітичні властивості культур *E. coli* визначали за їх здатністю до розрідження желатину, зсідання молока, розщеплення сечовини, засвоєння цитратно-амонійних солей, виділення індолу та сірководню, а також до гемолізу еритроцитів. Для цього використовували МПБ, м'ясо-пептонний

желатин, середовище із сечовиною, середовище Сімонса, знежирене молоко та КМПА.

Набір Rapid ID32 складається з 25 стрипів з кришками ID 32 E, які містять по 32 мікролунки з дегідрованим субстратом. Для приготування суспензії готували суспензію мікробних клітин у 0,85 % розчині натрію хлориду густиною 0,5 одиниць МакФарланда. При ручній інокуляції стрипу, гомогенізували суспензію і вносили по 55 мкл суспензії в кожную лунку, використовуючи мікропіпетку, та вносили по 2 краплі мінеральної олії в лунки URE, LDC, ODC. Після закриття стрип кришками, планшетку із стрипами інкубували за 36 ± 2 °C протягом 4–4,5 год в аеробних умовах. Після закінчення інкубації, реакцію в стрипах зчитували візуально.

Біологічні властивості ізольованих штамів досліджували на білих мишах вагою 14–16 г. Для цього готували суспензію добової культури, вирощеної на агарі, у фізіологічному розчині з концентрацією 500 млн мікробних тіл відповідно до бактеріального стандарту. По 0,25 см³ цієї суспензії вводили внутрішньоочеревинно трьом мишам, після чого проводили спостереження за тваринами протягом 5 діб. Загибель хоча б однієї білої миші свідчила про те, що культура тестованого штаму є ентеропатогенною.

Вакцинні препарати для отримання антигену готували із 24-годинної культури ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli*. Перший вакцинний препарат (ОН-антиген; група 1) був виготовлений із інактивованих формальдегідом (0,4 % від об'єму культури), концентрованих аеросилом А-300 (3 мг/мл) мікробних клітин. Суспензія містила 5×10^9 мікробних тіл в 1 см³. До інактивації культура представляла собою рухливі поліморфні грамнегативні палички розміром 0,8–1 $\times$ 2–5 мкм.

Другий вакцинний препарат (О-антиген; група 2) також готували з 24-годинної культури тестового штаму на тому ж середовищі. Інактивацію мікробних клітин проводили кип'ятінням протягом 1,5 год. Після інактивації препарат концентрували центрифугуванням за 4000 об/хв протягом 20 хв до

5×10^9 мікробних клітин; в суспензію мікробних клітин вносили аеросил А-300 у кількості 3 мг на 1 мл суміші для подальшого концентрування.

Як тварин-донорів використали клінічно здорових бугаїв голштинно-фризької породи віком 6–7 місяців і середньої кондиції. Для кожної групи вакцинних препаратів відібрано по 6 бугаїв. Підбір тварин проводили за принципом аналогів: всі вони були однорідні за віком, живою масою, а також утримувались, доглядались і годувались за однакових умов.

Для одержання імунних ешерихіозних сироваток тварин-донорів імунізували триразово (з інтервалом 4 доби). Вакцинні препарати вводили внутрішньом'язово. За першого введення доза становила 2,5 мл препарату, другого – 5 мл, а третього – 10 мл.

Для оцінки динаміки цитоморфологічних показників крові та біохімічних та імунологічних показників сироватки у тварин-донорів відбирали зразки крові у визначені строки: за 1 день до першого введення, а також на 9-ту та 30-ту добу після першого введення вакцини. У кожний із цих днів брали по 10 мл нестабілізованої крові і по 5 мл крові, стабілізованої гепарином.

В аналізованих пробах крові визначали вміст еритроцитів, лейкоцитів і рівень гемоглобіну. В сироватці крові визначали вміст загального білка, встановлювали білковий профіль сироватки, а також бактерицидну та лізоцимну активність сироватки (БАСК і ЛАСК), фагоцитарну активність нейтрофілів (ФА), фагоцитарний індекс (ФІ) і рівень аглютининів.

Для виділення сироватки пробірки з нестабілізованою кров'ю поміщали на 60 хв у водяну баню за температури 30 °С. Після утворення згустку крові його обережно відокремлювали від стінок пробірки. Пробірки з кров'яним згустком ставили в холодильник (4 °С) на 18–20 год для повного відділення сироватки. Після цього отриману сироватку відбирали стерильною піпеткою у чисті стерильні пробірки для подальших досліджень.

Загальну концентрацію білка в сироватці крові вимірювали за допомогою рефрактометра.

Бактерицидну активність сироватки крові (БАСК) визначали фотоколориметричним методом. Для цього готували калібровану суспензію добової культури кишкової палички (*E. coli*): оптичну густину суспензії доводили до рівня 0,48 за довжини хвилі $\lambda = 540$ нм за допомогою буферного фізіологічного розчину. Далі в стерильні пробірки вносили по 4,5 мл м'ясо-пептонного бульйону. В експериментальну пробірку додавали 1 мл досліджуваної сироватки, а в контрольну – 1 мл звичайного фізіологічного розчину. У кожную пробірку вносили по 1 краплі каліброваної суспензії культури кишкової палички. Після ретельного перемішування з кожної пробірки стерильною піпеткою відбирали по 2 мл суміші і вимірювали її оптичну густину на фотоколориметрі (це відповідало початковим показникам Ed_0 для дослідної і Ek_0 для контрольної пробірок). Потім пробірки інкубували за 37 °С упродовж 3 год. Після закінчення інкубації знову відбирали по 2 мл з кожної пробірки і вимірювали оптичну густину (тепер це були величини Ed_3 і Ek_3). Бактерицидну активність сироватки розраховували у відсотках.

Рівень антитіл у сироватці визначали методом розгорнутої РА. Як антиген для РА використовували 2-мільярдну суспензію формалінізованих клітин тієї ж культури *E. coli*, що й у вакцинах. Реакцію ставили в полістиролових планшетах на 72 лунки в об'ємі 1 мл: у кожную лунку вносили 0,5 мл серійно розведеної сироватки і 0,5 мл антигену. Сироватку розводили в буферному фізрозчині, починаючи з початкового розведення 1:5. Після ретельного перемішування суміші лунки витримували за температури $37 \pm 0,5$ °С упродовж 16–20 год, потім ще 4–8 год за кімнатної температури. Після цього, за наявністю і ступенем аглютинації у лунках оцінювали реакцію за 4-плюсовою системою. За титр антитіл приймали останнє розведення сироватки, у якому спостерігалася аглютинація з оцінкою не меншою, ніж 2+.

Профіль білкових фракцій у сироватці крові досліджували нефелометричним методом. Суть методу полягає в осадженні різних білкових фракцій фосфатними буферними розчинами з утворенням дрібного осаду, що зумовлює каламутність розчину. Для проведення аналізу спочатку готували основний фосфатний розчин, розчиняючи NaOH та KH_2PO_4 у дистильованій воді, а після його охолодження готували чотири робочі розчини з різною концентрацією фосфатів для диференційованого осадження альбумінів та глобулінів. У ході дослідження для кожної проби сироватки готували серію з шести пробірок, де перші чотири заповнювали відповідними робочими розчинами, а п'ята слугувала для приготування суміші сироватки з основним реактивом. Після перемішування вмісту п'ятої пробірки частину її об'єму переносили у робочі та контрольну пробірки. Вимірювання оптичної густини проводили через 15 хв після змішування, використовуючи червоний світлофільтр та кювету з оптичним шляхом 1 см, при цьому фотоколориметрію здійснювали у зворотній послідовності від четвертої пробірки до першої відносно контролю. Індекс каламутності (інтенсивність світлорозсіювання) отриманої суміші прямо пропорційний концентрації відповідної білкової фракції та реєструється за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК). Обчислення різниці отриманих оптичних густин між суміжними пробами дозволяє виокремити показники для альбумінів та глобулінів.

Отримані результати спочатку виражали у відсотках від загальної суми значень оптичної густини, а після отримання даних про рівень загального білка рефрактометричним методом здійснювали перерахунок у грами на літр для отримання абсолютних значень кожної фракції. Для розрахунку використовували наступні формули (2.1-2.5) [16]:

$$E_{\text{альбумінів}} = E_{\text{пробірки №1}} - E_{\text{пробірки №2}}, \quad (2.1)$$

$$E_{\alpha - \text{глобулінів}} = E_{\text{пробірки №2}} - E_{\text{пробірки №3}}, \quad (2.2)$$

$$E_{\beta} - \text{глобулінів} = E \text{ пробірки № 3} - E \text{ пробірки № 4}, \quad (2.3)$$

$$E_{\gamma} - \text{глобулінів} = E \text{ пробірки № 4}, \quad (2.4)$$

$$\% \text{ кожної фракції} = \frac{E_{\text{фракції}}}{E_1} \times 100, \quad (2.5)$$

де E – екстинція.

Для визначення фагоцитарної активності (ФА) нейтрофілів і фагоцитарного індексу (ФІ), використовували іммобілізований метод фагоцитозу. У пробірки вносили по 0,2 мл стабілізованої крові і додавали по 0,2 мл суспензії 24-годинної культури кишкової палички (2×10^9 клітин/мл). Уміст пробірок ретельно перемішували і ставили у водяну баню за 37 °C на 30 хвилин для забезпечення контакту мікроорганізмів з нейтрофілами. Після інкубації з вмісту пробірок готували тонкі мазки крові, які фіксували метиловим спиртом і фарбували за методом Романовського-Гімзи. У кожному мазку підраховували по 100 нейтрофілів. Фагоцитарну активність виражали як відсоток активних нейтрофілів (таких, що захопили хоча б одну бактеріальну клітину) серед 100 підрахованих. Фагоцитарний індекс визначали як середню кількість бактеріальних клітин, фагоцитованих одним активним нейтрофілом.

Для позбавлення імунної ешерихіозної сироватки від перехресних реакцій до ОН-антигенів гетерологічних видів мікроорганізмів сироватку адсорбували 2-мільярдною суспензією двічі відмитих 0,85 % розчином натрію хлориду інактивованих формаліном мікробних клітин 12-годинної культури *S. enteritidis*. Адсорбування проводили за 37 °C упродовж 30 хв, постійно помішуючи. Після цього суміш сироватки із мікробною масою бактерій-адсорбентів центрифугували (7000 обертів, 30 хв, 4 °C) для осадження аглютинату бактерій. У розгорнутій РА визначали титр аглютинінів до ОН-антигенів гетерологічних штамів *E. coli* та ОН-антигенів гетерологічних видів бактерій.

Після досягнення високої видоспецифічності антитіл до *E. coli*, виділяли загальну глобулінову фракцію білків із сироватки методом висолювання

насиченим розчином сульфату амонію. До сироватки, охолодженої до 0–4 °С, при постійному перемішуванні поступово додавали рівний об'єм попередньо охолодженого до тієї ж температури насиченого розчину сульфату амонію. Отриману суміш витримували при 0–4 °С протягом 1 години, після чого центрифугували при 7000 об/хв за температури 2–4 °С. Надосадову рідину зливали, а осад глобулінів розчиняли в охолодженій до 4 °С дистильованій воді, доводячи об'єм до початкового об'єму неадсорбованої сироватки.

Для підвищення чистоти білків ми повторно осаджували глобуліни насиченим розчином сульфату амонію ще двічі за тією ж процедурою. Після останнього осадження глобуліни розчиняли у мінімальній кількості 0,85 % розчину натрію хлориду (рН 7,2–7,4), де досягалося повне розчинення білків. Потім розчин знову центрифугували у тому ж режимі для видалення можливих механічних домішок.

Отриманий розчин глобулінів очищали від залишкового сульфату амонію за допомогою гелевої фільтрації з використанням сефадексу G-50.

Звільнення розчину глобулінів від сульфату амонію проводили методом гелевої фільтрації на колонці, заповненій сефадексом. Для цього використовували колонку заввишки 40 см і діаметром 3,5 см; висота гелевого шару становила 30 см.

Спочатку проводили підготовку сефадексу шляхом його замочування у дистильованій воді за постійного перемішування. Спливаючі частинки видаляли шляхом зливання рідини, а осад знову ресуспендували у свіжій порції води. Процедуру повторювали до повного припинення спливання дрібних частинок. Після цього сефадекс залишали у воді на 24 години для набухання. Заповнення колонки суспензією набухлого сефадексу здійснювали при закритому крані, щоб забезпечити рівномірне осідання гелю. Перед проведенням гелевої фільтрації гель у колонці зрівноважували 0,1 М фосфатним буфером з рН 7,6, пропускаючи через нього 2–3 об'єми буфера, що відповідали об'єму гелю в колонці.

Розчин глобулінів на поверхню гелю нашаровували обережно з допомогою пастерівської піпетки при закритому крані колонки. Після цього встановили швидкість витікання елюату в 1–1,5 см³/хв. У колонку поступово додавали буфер зі швидкістю, що дорівнює швидкості витікання елюату.

Наявність солей амонію у фракціях, що витікають, визначали реактивом Неслера.

В очищених глобулінах визначали концентрацію білка за методом Лоурі [16].

Видоспецифічні ешерихіозні глобуліни досліджували на активність і специфічність в РА, розливали у стерильні поліетиленові або скляні ампули по 2–5 см³ і зберігали у морозильній камері.

В очищених глобулінах визначали концентрацію білка за методом Лоурі [16].

Для зв'язування глобулінів із ФІТЦ готували кон'югаційну суміш, яка містила розчин глобулінів з концентрацією білка 15–25 мг/см³, карбонатний буфер (рН 9,5) у кількості 15 % від загального об'єму суміші, а також ФІТЦ із розрахунку 15 мг на 1 г білка.

Спершу ФІТЦ розчиняли в половині об'єму карбонатного буфера, відібраного для приготування суміші, після чого отриманий розчин повільно, краплями та при постійному перемішуванні на магнітній мішалці додавали до розчину глобулінів. Посудину, в якій розчиняли ФІТЦ, двічі ополіскували рештою буфера і також додавали до загальної суміші. Кон'югаційну суміш перемішували на магнітній мішалці за кімнатної температури протягом 1 год, а далі залишали інкубуватись ще на 16–18 год за температури 2–4 °С.

Для приготування карбонатного буфера готували 0,5 М розчини Na₂CO₃ (5,3 г на 100 см³ дистильованої води) та NaHCO₃ (4,2 г на 100 см³ води). Для отримання буфера з рН 9,5 змішували 2 частини розчину Na₂CO₃ та 8 частин розчину NaHCO₃. рН перевіряли потенціометрично і, за потреби, коригували співвідношенням компонентів.

Після інкубації мічені глобуліни очищували від незв'язаного ФІТЦ методом гелевої фільтрації. Для зрівноваження гелю в колонці та як елюент використовували 0,1 М розчин натрію хлориду з рН 7,6.

Приготовані згідно з описаною вище методикою глобуліни, мічені ФІТЦ, перевіряли на активність і специфічність у прямому варіанті МФА. Як антигени для виготовлення мікропрепаратів використовували завіс інактивованих мікробних клітин тест-штамів *E. coli* та інших видів бактерій.

На попередньо знежирених предметних скельцях, розкреслених маркером на 10–12 рівних квадратів, наносили по 10–12 мазків із суспензії вегетативних клітин. Мазки підсушували та фіксували. Далі на них наносили мічені глобуліни у двократних серійних розведеннях, починаючи з найвищого.

Препарати інкубували у вологій камері за температури 37 °С упродовж 30 хв, після чого промивали проточною водою протягом 10 хв, висушували й розглядали під люмінесцентним мікроскопом. Оцінку результатів проводили за чотирибальною (чотириплюсовою) системою:

- ++++ – сяюче німбоподібне зеленувате світіння периферії клітини;
 - +++ – яскрава зеленувата люмінесценція бактеріальної клітини з добре помітним периферійним контуром;
 - ++ – слабо виражене зеленувато-жовте світіння поверхні клітини;
 - +
- слабке гомогенне світіння клітини без видимого контуру.

Позитивною РІФ вважали за умови світіння не менше, ніж на 2 плюси.

Як контролі слугували:

- мікропрепарати *E. coli*, оброблені неімунною сироваткою великої рогатої худоби;
- мікропрепарати 14-годинних культур герерологічних видів бактерій, оброблених міченими ешерихіозними глобулінами.

Отримані результати досліджень обробляли методом варіаційної статистики за допомогою електронних таблиць Excel [17, 25]. При цьому визначали середнє арифметичне (М), статистичну помилку середнього

арифметичного (m), вірогідність різниці між середніми арифметичними двох варіаційних рядів за критерієм вірогідності (P). Різницю вважали вірогідною, коли значення P дорівнювало або було меншим 0,05; 0,01; 0,001.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Епідеміологічні аспекти ешерихіозів людини у країнах світу та в Україні

У літературі відсутні фундаментальні дослідження щодо всіх ланок епідемічного ланцюга ешерихіозів. Зазвичай останній розглядається з позицій сапронозного або ентобіотичного паразитизму. Зрештою, не розроблені експрес-методи мікробіологічного скринінгу циркуляції збудника в зовнішньому середовищі і, як наслідок, відсутній теоретичний і методичний базис управління епідемічним процесом ешерихіозу.

До епідеміологічних аспектів ешерихіозів людини, в першу чергу, слід віднести просторово-часову динаміку їх прояву, незалежно від клінічних форм інфекційного процесу. Зазвичай часова динаміка обмежується певним періодом, у даному випадку 2001–2024 рр.

C. Troeger *et al.* [71] оцінили діарею як одну з головних причин смерті дітей віком до 5 років. Тільки у 2016 році від цієї недуги померло близько півмільйона дітей. Азія, Африка та Америка належать до континентів, які повідомили про високі показники смертності дітей до двох років внаслідок діареї [59, 119].

Y. Zhou *et al.* [48] показали, що однією з причин діареї у дітей у країнах, що розвиваються, є патогенні штами *E. coli*. При цьому ЕПКП є найчастішим патотипом діареєгенних *E. coli* (DEC) у дітей з гострою діареєю, при цьому атипова ентеропатогенна кишкова паличка є домінуючим збудником діареї в центральному Китаї.

В Австралії та країнах Океанії інфекції сечовидільних шляхів (ІСШ) завдають величезних збитків суспільству і становлять серйозну медико-соціальну проблему [34, 62]. A. Gündoğdu *et al.* [34], провівши геномні дослідження ретроспективних колекцій кишкової палички, пов'язаної з ІСШ,

відзначили важливість застосування сучасних технологій для вивчення так званих архівних ізолятів клінічних популяцій позакишкової патогенної *E. coli* (ExPEC). Такі дослідження можуть забезпечити розуміння геномних основ уропатогенності та можливих способів протидії їй. ІСШ знижують якість життя пацієнтів і нерідко призводять до розвитку важких станів, зокрема уросепсису. Основною причиною ІСШ є ExPEC. Щорічно вони спричиняють приблизно 69823 госпіталізацій, завдаючи системної шкоди здоров'ю австралійців на 909 мільйонів австралійських доларів щорічно [40].

Пандемічні лінії ExPEC, такі як ST131, відіграють головну роль у глобальному збільшенні спектру β -лактамазо-продукуючих *E. coli*, а також у зростанні резистентності до інших клінічно важливих класів антибіотиків [121].

A. R. Manges (2019) відзначає, що ExPEC є найпоширенішою причиною ІСШ, а лікування антибіотиками, особливо неконтрольоване, посилює селекцію та еволюцію протимікробної стійкості. У всьому світі вона найчастіше ідентифікується як грамнегативний збудник внутрішніх кровотеч і ранових інфекцій, неонатального менінгіту та вентиляційної пневмонії [102].

J. H. Lee et al. [120] відзначили, що ІСШ є одними з найпоширеніших захворювань у Південній Кореї, і спричиняються переважно уропатогенною кишковою паличкою (УПКП). Проаналізувавши фактори вірулентності та філогенетичні групи серед різних ізолятів УПКП від дітей з ІСШ, дослідники встановили, що більшість штамів, відповідальних за ІСШ, належать до філогенетичних груп B2 (79,31%) та D (15,51%) і незначна кількість до групи A (3,44%) та до B1 (1,72%). При цьому множинна лікарська стійкість ізолятів тісно корелює із наявністю у них генів вірулентності.

K. Islam et al. [66, 73], вивчаючи поширеність *E. coli*, що продукує β -лактамази розширеного спектру (ESBL) та метало- β -лактамази (MBL) у країнах Південній Азії, встановили, що сукупна поширеність *E. coli*, які продукують ESBL та MBL становила 33% і 17% відповідно і, що ESBL та MBL

мають високу поширеність серед клінічних ізолятів *E. coli*. Автори рекомендували запровадити комплексне спостереження за резистентністю до антимікробних препаратів відповідно до принципу «Єдине здоров'я» з метою пом'якшення наслідків застосування антимікробних препаратів у країнах Південної Азії, що буде суттєвою допомогою клініцистам у призначенні ефективних антибіотиків.

J. Shindou et al. [74] вперше ідентифікували у клінічному ізоляті *E. coli* з гемокультури ген ESBL – blaVEB-1. Ізолят проявляв високу стійкість до цефалоспоринів широкого спектру дії та був класифікований як ExPEC та уропатогенна *E. coli* (UPEC). Дослідники підкреслюють важливість ретельного моніторингу ізолятів *E. coli* на наявність гену ESBL – blaVEB-1 для запобігання поширенню цієї детермінанти резистентності в Японії.

A. M. Lupindua [100] у своєму огляді на епідеміологію STEC O157:H7 повідомив, що понад чверть африканських країн ідентифікували STEC-ізоляти як O157:H7 від людей, тварин, продуктів харчування та об'єктів навколишнього середовища. Автор відзначив, що відсутність прямого зв'язку між ізолятами *E. coli* від хворих людей та іншими джерелами не дозволяє встановити детермінантність та вектор передачі збудника у кожному конкретному спалахові інфекції.

R. M. M. Khairy et al. [130], провівши комплексні дослідження 320 зразків фекалій від дітей віком до 5 років з діареєю у лікарнях верхнього Єгипту, встановили, що DEC були виділені у 20,6% зразків. Найбільшу питому вагу серед DEC становили EAEC – 47%, далі йшли типові EPEC – 28,8% та атипові EPEC – 16,6%. Як супутня інфекція EPEC та EAEC була виявлена у (7,6%) ізолятів. Проте, ентеротоксигенні, ентероінвазивні та ентерогеморагічні *E. coli* не були виділені. Частина ізолятів була віднесена до філогрупи A (47%), а частина до B2 (43,9%). Мультирезистентність (MP) була виявлена у 55% ізолятів DEC. Гени β -лактамаз розширеного спектру (ESBL) були виявлені у 24 ізолятах.

Подібні дослідження були проведені і в країнах Америки та Європи [36, 158, 162], у яких зазначено, що рівень зараження у віковому період 1-2 роки є значно вищим, ніж у старшому віці.

Zilberberg M. D., Shorr A. F. [167], дослідивши частоту госпіталізацій з приводу ІСШ за період 2000-2009 рр. у США відзначали, що вона зросла приблизно на 50% (з 53 до 77 випадків на 1000 госпіталізацій). Інфекції, спричинені такими грамнегативними бактеріями як *Pseudomonas aeruginosa* і *Klebsiella pneumoniae*, мали схожі тренди зростання (в межах 50%), тоді як інфекції, спричинені ESBL-*E. coli*, зросли майже на 300%. Автори відзначили, що резистентні грамнегативні бактерії стають більш поширеними та пов'язані зі зростаючою часткою ІСШ серед госпіталізованих пацієнтів.

C.-Y. J. Poh et al. [82], досліджуючи мікробіологічні характеристики та навантаження STEC O157:H7 на громадське здоров'я населення, включно із клінічно значущим серотипом O103:H2 в Англії та Уельсі впродовж 2014-2022 років, спостерігали збільшення кількості серотипів STEC, відмінних від O157, включаючи STEC O103:H2. Більшість спалахів інфекції реєстрували у жінок (58,5%), причому найбільша частка випадків належала до вікової групи 0–4 роки ($n=83/424$, 19,6%). За даними клінічної картини на діарею припадало 92,1%, біль у животі – 72,4% та кров у калі – 55,3%, а в 1,3% розвинувся гемолітико-уремічний синдром. П'ятьма найпоширенішими серотипами були O103:H2 (64,5%), O123:H2 (11,1%), O151:H2 (6,6%), O71:H2 (3,3%) та O4:H2 (2,6%).

Подібні результати отримали й інші дослідники. Зокрема L. Byrne et al. [64], проаналізувавши демографічні, мікробіологічні та клінічні характеристики STEC, дані лабораторних спостережень та захворюваності в Англії, встановили, що за період 2016-2023 років спостерігалось майже 10-кратне збільшення кількості STEC, відмінних від O157 (у 2016 році їх кількість становила 297, а у 2023 році – 2341). Більша частка випадків STEC, відмінних від O157, була у жінок (56%) та в осіб віком від 20 до 39 років (27%).

Найпоширенішими серотипами, відмінними від O157, були O26:H11 (16%), O146:H21 (12%), O91:H14 (11%), O128:H2 (6%), O145:H28 (5%) та O103:H2 (4%). STEC O26:H11 частіше (38%) виявляли у дітей віком до 5 років, ніж у будь-якій іншій віковій групі.

Дитяча діарейна інфекція у країнах з низьким рівнем доходу є високим ризиком для громадського здоров'я, тренд захворюваності на цю інфекцію щорічно зростає, вона важко піддається лікуванню через появу штамів, резистентних до антибіотиків [145]. Антибіотикорезистентність ізолятів діарейної кишкової палички, яка набула значного поширення в країнах, що розвиваються, пов'язують із надмірним і неконтрольованим використанням антибіотиків. Подорожування є одним із ключових факторів, що сприяє глобальному поширенню опірності до антибіотиків. Цефотаксим-гідролізуючі β -лактамази (CTX-M) вважаються найбільш клінічно значущими бета-лактамазами з розширеним спектром активності (ESBLs) [93].

Вивченням ешерихіозів в Україні займалися й низка інших науковців [13]. Так, Т. М. Пахольчук та ін. [22], провели ретроспективний аналіз клініко-лабораторних особливостей перебігу ешерихіозів у 178 дітей віком від 1 місяця до 15 років, яких лікували у кишковому відділенні обласної інфекційної лікарні та у діагностичному відділенні міської дитячої клінічної лікарні м. Запоріжжя впродовж 2010-2016 років. Було встановлено, що у структурі ешерихіозів дітей старшого віку превалювали ентероінвазивні (серотипи O124 і O144) та ентеропатогенні (O18 і O44), а у дітей до трьох років – ентеротоксикогенні (O25 и O126, O6) та ентерогеморагічні (O26 и O11) кишкові палички.

Є. С. Ольховський [21] встановив, що у дітей віком до 5 років на частку гострих діарейних інфекцій припадає 13 % від загальної кількості летальних випадків. Спектр збудників гострих кишкових інфекцій дуже різноманітний і включає бактерії, віруси і найпростіші. Частка моноінфекції *E. coli* в дитячому

віці досягає 4,8 % і досягає до 10,3 % при поєднанні їх з іншими збудниками кишкових інфекцій.

Н. Г. Малиш, М. Д. Чемич [18], провівши ретроспективний епідеміологічний аналіз захворюваності на діареєгенні ешерихіози (ДЕ) у Сумській області за період 2003–2013 рр., встановили, що захворюваність населення на DEC була в межах 1,7–5,4 рсм і мала тенденцію до зростання. Автори відзначили, що захворюваність на DEC була найвищою у дітей віком до 1 року і становила 36,7-259,3 рсм. У дітей віком 1–14 років захворюваність на DEC мала тенденцію до постійного зростання, а в цілому по області прояв DEC мав виражений сезонний характер, що припадав на весняно-літній період. В етіологічній структурі DEC домінували серогрупи ентероінвазивні кишкові палички (ЕІКП) ($33,6 \pm 2,1$ %), зокрема штами *E. coli* O1 ($29,4 \pm 1,9$ %) та ЕРЕС ($26,5 \pm 1,9$ %). На думку дослідників, головним напрямком профілактики ДЕ повинні стати заходи, спрямовані на першу і другу ланку епідемічного ланцюга – джерело збудника та механізм передачі збудника інфекції, зокрема на своєчасне виявлення ентеропатогенних штамів в біотичних та абіотичних об'єктах довкілля, а тоді на нейтралізацію харчового шляху.

Отже, провівши епідеміологічний аналіз літературних даних, що стосуються особливостей прояву епідемічного процесу за ешерихіозів населення, можна зробити такі проміжні висновки, що :

1. У країнах світу епідемічна ситуація щодо ешерихіозів населення є напруженою, в більшості країн мало вивченою.

2. Епідемічний процес за ешерихіозів характеризуються постійністю його прояву, але з різною інтенсивністю як в окремі роки (часова динаміка епідемічного процесу), так і у різних країнах світу (просторова динаміка).

3. Форми прояву інфекційного процесу у дітей мають більше виражений кишково-діарейний синдром, рідше позакишкові патології (сепсис і менінгіт), у людей середнього віку – харчові токсикоінфекції ешерихіозної природи (діарея мандрівників), тоді як у людей похилого віку переважають

позакишкові ураження (інфекції сечовивідних шляхів, цистит та гострий пієлонефрит).

4. Поширенню патогенних штамів *E. coli* серед людей сприяють наявність множинної стійкості ізолятів кишкової палички до антибіотиків, що в свою чергу потребує запровадження комплексного спостереження за резистентністю до антимікробних препаратів.

5. Штами *E. coli*, які продукують вероцитотоксин (VTEC), впродовж 2001–2024 рр. набули важливого медико-соціального значення як харчові патогени. Ізоляти VTEC можуть належати до багатьох серотипів, але найважчі інфекції людини (геморагічний коліт, гемолітико-уремічний синдром та тромбоцитопенічна пурпура) головно спричиняються штамми *E. coli* O157:H7.

6. STEC можуть спричиняти епідемічні спалахи тяжких шлунково-кишкових захворювань харчового походження, особливо у молодих та літніх людей. STEC відносяться до зоонозних шлунково-кишкових патогенів і характеризуються наявністю гену шига-токсин (stx). Донедавна STEC O157:H7 вважався найбільш клінічно значущим серотипом. Проте, впродовж проаналізованого нами періоду, спостерігалось збільшення кількості серотипів STEC, відмінних від O157, включаючи STEC O103:H2.

7. Українські вчені встановили, що у структурі ешерихіозів дітей старшого віку превалювали ентероінвазивні та ентеропатогенні, а у дітей до трьох років – ентеротоксикогенні та ентерогеморагічні кишкові палички; захворюваність на діареєгенні ешерихіози (ДЕ) за період 2003–2013 рр. була в межах 1,7–5,4 psm і мала тенденцію до зростання, в той час як захворюваність на ДЕ була найвищою у дітей віком до 1 року і становила 36,7–259,3 psm.

Отже, ешерихіози мають важливе медико-епідеміологічне значення, а тому вивчення особливостей основних рушійних сил епідемічного процесу за ешерихіозів та факторів, що мають сприяючий чи схиляючий вплив на його прояв, є актуальним для ефективного управління цим процесом.

Повідомлення про виділення ентеропатогенних кишкових паличок від тварин, зокрема від великої рогатої худоби як потенційного джерела збудників ешерихіозів людини надходять з усіх континентів. Так, В. Atnafie *et al.* [114] підтвердили наявність *E. coli* O157:H7 у великої рогатої худоби, забитої на муніципальній бойні міста Хавасса, (Ефіопія), та у м'ясі за роздрібною торгівлі в м'ясних магазинах. Із 630 бактеріологічно досліджених зразків у 2,4% (15/630) була ідентифікована *E. coli* O157:H7.

Подібні результати було отримано низкою інших дослідників. Зокрема, N.D. Tadese *et al.* [113], вивчаючи поширеність *E. coli* O157:H7 у сирій яловичині, а також у м'ясі на бойнях та в роздрібних магазинах міста Амбо (Ефіопія), встановили, що рівень інфікування зразків м'яса був високим – на бойнях 7,2% і 19,1% у магазинах роздрібною торгівлі.

S.L. Abey *et al.* [58] в рамках стратегії «Єдине здоров'я» з грудня 2020 року по червень 2021 року провели дослідження 384 зразків з рук, туш, ножів, фекалій великої рогатої худоби, води з боєнь та стічних вод працівників боєнь (північно-західна Ефіопія). При цьому вони виділи 115 (29,95%) ізолятів кишкової палички; з них 17 (14,8%) ізолятів були ідентифіковані як діарейні кишкові палички (DEC).

Подібні результати були отримані іранськими вченими, які дослідивши 120 зразків м'яса із охолоджених туш яловичини, виділили та ідентифікували 8 штамів *E. coli* O157:H7 із десяти ізолятів кишкової палички.

C. Cagney *et al.* [126] протягом 13-місячного періоду досліджували поширеність *E. coli* O157:H7 у яловичому фарші та яловичих бургерах у супермаркетах та м'ясних магазинах Республіки Ірландія. Із 1533 досліджених зразків було виділено 43 ізоляти *E. coli* O157:H7 (2,8%).

Роль великої рогатої худоби як природного резервуару шига-токсигенного β -гемолітичного штаму *E. coli* O157:H7 довели наукові розвідки з інших країн світу, зокрема Мексики [89], Норвегії [70], США [65], Англії [47].

E. coli O157:H7 вперше була ідентифікована як причина тяжкої кривавої діареї, пов'язаної із забрудненими гамбургерами, у 1982 році [86]. З того часу цей патоген асоціюється як збудник кривавої діареї і геморагічного уремичного синдрому у дітей – найпоширенішої причини гострої ниркової недостатності. Спалахи цих захворювань в більшості випадків були пов'язані із вживанням недовареного яловичого фаршу, ростбіфів, сирого молока та яблучного сидру, гамбургерів та інших м'ясних виробів із яловичини [46, 147].

З іншого боку, варто відзначити, що джерелом і природним резервуаром ентеропатогенних *E. coli* є не лише велика рогата худоба, але й інші види тварин. Так, польські науковці A. Nowaczek *et al.* [33], виділили 32 ізоляти *E. coli* із 34 зразків, відібраних від диких птахів. З них 5 ізолятів були віднесені до групи АРЕС (Avian pathogenic *E. coli*). Дослідники довели, що дикі птахи можуть бути носіями потенційно патогенних штамів *E. coli*.

Подібні результати отримали M.P.V. Cunha *et al.* [157], які встановили, що більшість із 225 ізолятів АРЕС, виділених від індиків з аеросакулітом, були ентеропатогенними та мультирезистентними.

S. Saputra *et al.* [35], дослідивши частоту виникнення мультирезистентності в ізолятів *E. coli*, виділених від домашніх тварин (собак, котів та коней), встановили, що мультирезистентна (МР) *E. coli* є серйозною проблемою для охорони здоров'я як людей, так і тварин та зазначили, що попереднє захворювання та попереднє застосування антимікробних препаратів були «основними ризиками, пов'язаними з інфекцією сечовивідних шляхів, спричиненою МР *E. coli*, у домашніх тварин».

M. G. Spindola *et al.* [81], дослідивши 186 ізолятів уропатогенних кишкових паличок (УПКП), виділених від свиноматок, встановили, що свині із ферм, де реєструють клінічні форми колібактеріозу, можуть бути резервуаром уропатогенних та мультирезистентних штамів *E. coli*.

На колібактеріоз хворіє в основному новонароджений молодняк усіх видів тварин: телята у віці 2–7 діб; ягнята – з перших днів життя до 2–3-

тижневого віку; поросята – з перших днів життя до 2-денного віку, лошата – з перших днів життя; курчата – від 1- до 90-денного віку, а також кури-несучки у період яйцевідкладання. У поросят в період відлучки колібактеріоз може проявлятися у формі набрякової хвороби [12].

К. Rothman *et al.* [136] довели, що рушійними силами епідемічного процесу за будь-якої інфекційної хвороби є джерело збудника інфекції, механізм його передачі та сприйнятливий організм, взаємодія яких завжди відбувається на тлі впливу різноманітних факторів (природних, соціальних).

Аналіз випадків ешерихіозної інфекції в поточному дослідженні показав, що кишкові палички абіотичних та біотичних об'єктів зовнішнього середовища є потенційними збудниками ешерихіозів людини, а виживання популяції кишкової палички як патогена у популяції людини продовжується, тобто еволюція патогенності кишкової палички триває, і, завдяки міграційним процесам, які з кожним роком стають все інтенсивніші, це відбувається значно швидше. Більше того, кишкова паличка із сапрофітного та ентобіотичного способу існування все частіше переходить на бік завершеного патогена, про що свідчить велике розмаїття клінічних форм її хвороботворного впливу на організм, а також множинність антигенних варіантів і патогенних типів, що їх спричиняють.

Еволюції паразитизму *E. coli* сприяють такі чинники як збільшення контактів між носіями збудника і сприйнятливими організмами. Аналіз матеріалів наукових досліджень показав наскільки розмаїтими є джерела ентеропатогенних форм кишкової палички.

Отже, аналіз літературних даних, що стосуються особливостей прояву епізоотичного процесу за колібактеріозу домашніх, свійських і диких тварин та птахів, свідчить про те, що ешерихіозна інфекція серед тварин – явище дуже поширене, проявляється низкою форм клінічного прояву та широким бактеріоносійством. Останнє має надзвичайно важливе епідеміологічне значення, бо тварини-бактеріоносії кишкової палички є потенційними

джерелами та резервуарами ентеропатогенних кишкових паличок, сприяють їх переживанню та продовженню еволюції патогенності *E. coli*. Тому розробка експрес-методів бактеріологічного чи імунологічного скринінгу (а метод флуоресціюючих антитіл поєднує в собі обидва методи) поширення ентеропатогенних кишкових паличок в об'єктах є актуальним науковим завданням, вирішення якого матиме визначальний вплив на ефективне управління епідемічним та епізоотичним процесами за ешерихіозів людини і тварин.

3.2. Епідеміологічний аналіз стану контамінації води відкритих водойм та систем водопостачання у Волинській області за період 2020–2024 рр.

Аналізу були піддані дані відомостей Національних доповідей про якість питної води в Україні та дані Регіональних доповідей про стан навколишнього природного середовища у Волинській області за період 2020–2024 рр. Ці дані були представлені нам Волинським обласним центром контролю та профілактики хвороб МОЗ України. Аналізувалися лише результати мікробіологічних досліджень проб води відкритих водойм та систем водопостачання за показником рівня кишкової палички (КУО/дм³).

Відомо, що поза організмом людини і тварин основні природні резервуари *E. coli* пов'язані з водним середовищем, що є наслідком потрапляння у них неочищених або недостатньо очищених стічних вод. Внаслідок цього формуються стійкі осередки фекального забруднення у поверхневих та рекреаційних водоймах. Тому для оцінки санітарного стану води широко використовують *E. coli* як індикаторний мікроорганізм [92].

Для оцінки рівня контамінації було проаналізовано показники забруднення водойм кишковою паличкою в межах Волинської області та в цілому по країні за період 2020–2024 рр.

З даних, наведених на рисунку 3.1, питома вага проб води відкритих водойм, що не відповідають нормативам за мікробіологічними показниками, в Україні з 2020 до 2023 року має тенденцію до зростання; у 2024 році цей показник дещо знизився, проте залишався досить високим (28,2%). У Волинській області з 2020 до 2022 року питома вага проб води відкритих водойм, що не відповідають нормативам за мікробіологічними показниками, різко зростала (з 8,6% до 32%) і у 2022 році цей показник суттєво перевищував загальнонаціональний. Проте, з 2023 року він різко знизився і у 2024 р був найнижчим за останні 5 років (7,3 %).

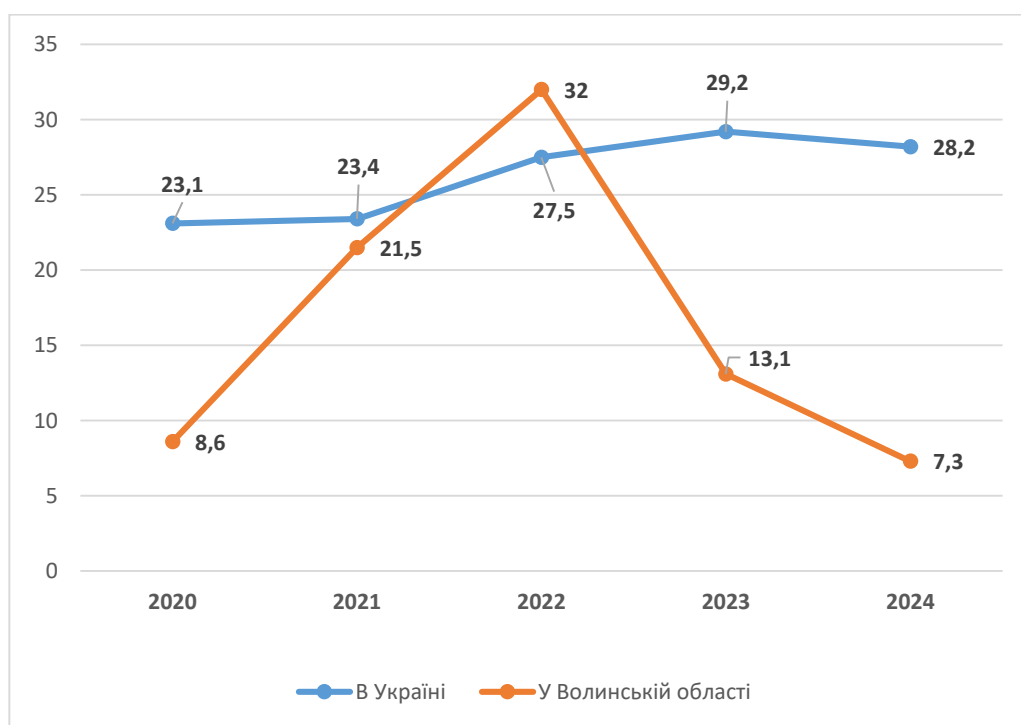


Рис. 3.1. Динаміка питомої ваги (у %) проб води відкритих водойм, що не відповідають нормативам за мікробіологічними показниками, за період 2020–2024 рр. в Україні та у Волинській області.

Потрібно відзначити, що згідно з діючими санітарними нормами (наказом МОЗ №2005 від 03.12.2024 р., зі змінами від 25.12.2024 р. та 29.07.2025 р. «Про затвердження Гігієнічних нормативів якості води для

купання»), вміст кишкової палички у воді відкритих водойм у місцях водокористування населення не повинен перевищувати 9×10^3 КУО/дм³.

Аналіз даних свідчить про системне та значне перевищення цього показника у значної частини обстежених об'єктів (37,14%). Особливо критична ситуація спостерігається на річкових об'єктах у межах міських територій (рис. 3.2).

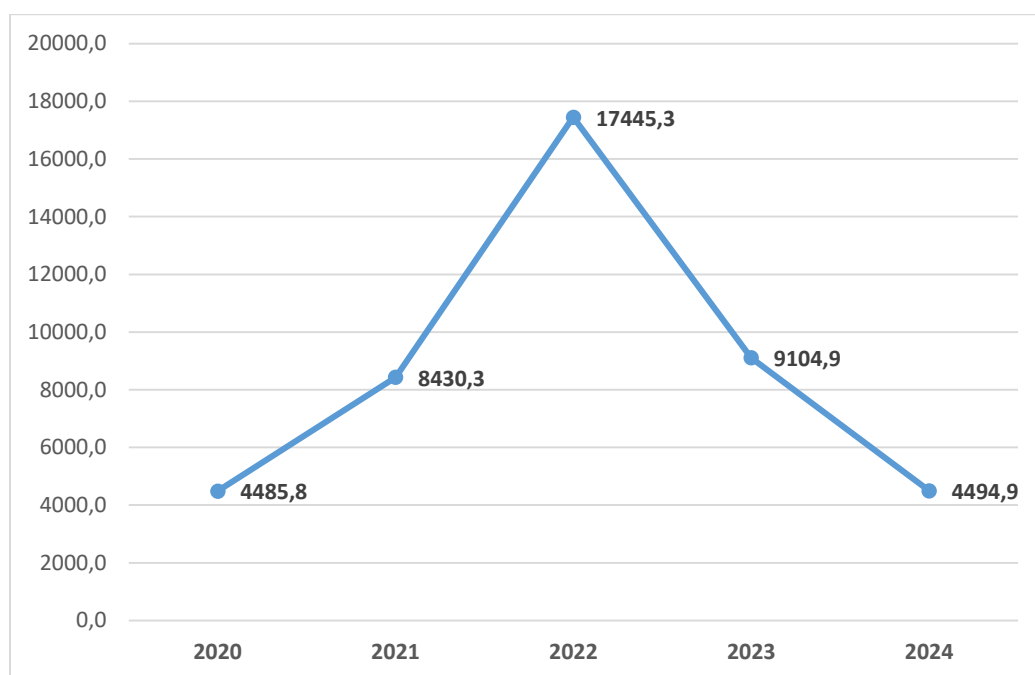


Рис. 3.2. Середньорічні показники забруднення кишковою паличкою водних об'єктів господарсько-побутового призначення у Волинській області за 2020-2024 роки (КУО/дм³).

Дані рисунка 3.2 вказують на різке зростання рівнів кишкової палички у воді водних об'єктів господарсько-побутового призначення у 2022 році, тоді як у 2024 р. намітилася тенденція до їх зниження у більшості пунктів, порівняно з попередніми роками.

Проте, як показують дані, наведені у таблиці 3.1, серед водних об'єктів господарсько-побутового призначення у Волинській області є низка локацій із високими показниками забруднення кишковою паличкою.

Таблиця 3.1

Середньорічні показники забруднення кишковою паличкою низки водних об'єктів господарсько-побутового призначення у Волинській області за 2020-2024 роки (КУО/дм³)

№ з/п	Назва об'єкта	2020	2021	2022	2023	2024
1	р. Турія (м. Ковель, центральний пляж)	46000	110000	46000	46000	15000
2	оз. Луки (Старовижівський район)	650	1900	46000	110000	немає даних
3	оз. Турійське (Турійський район)	4300	4300	46000	46000	3950
4	р. Вижівка (сmt. Стара Вижва)	600	немає даних	46000	10000	16200
5	оз. Пісочне (Старовижівський район)	650	немає даних	46000	5000	14400
6	р. Стир (м. Луцьк, центральний пляж)	24000	24885	15000	8500	10114
7	р. Припять (сmt. Ратне)	1900	1400	1900	1500	600
8	оз. Тросне (с. Карасин)	1000	1000	1000	1500	1200
9	оз. Велике Згоранське, (с. Згорани)	1000	16000	46000	2600	3100
10	оз. Світязь, урочище Гряда	1000	4300	46000	2100	3950

Як видно із наведених у таблиці 3.1 даних, найбільш забрудненими локаціями є:

- р. Турія (м. Ковель) – найвищий рівень забруднення у 2021 році (110000 КУО/дм³); стабільно високими показники забруднення кишковою паличкою (від 46000 до 15000 КУО/дм³) свідчать про постійне антропогенне навантаження (скид стічних вод).

- оз. Луки (Старовижівський р-н) – зафіксовано поступове зростання вмісту кишкової палички від 650 КУО/дм³ у 2020 р. до 110000 КУО/дм³ у 2023 р.

- р. Стир (м. Луцьк) – виявлене високе забруднення кишковою паличкою води у 2020–2022 роках (24885–15000 КУО/дм³) з помітним зниженням показників забруднення упродовж останніх двох років.

Середньорічні показники мікробного забруднення проб води питного водопостачання та водовідведення в Україні впродовж 2020–2024 рр. наведено на рисунку 3.3.

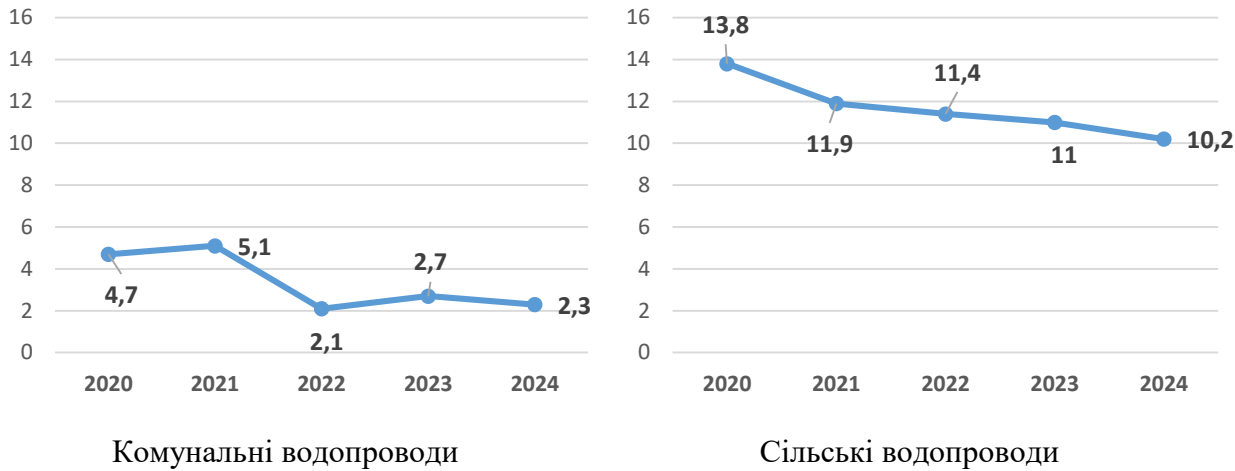


Рис. 3.3. Динаміка показників питомої ваги (у %) досліджуваних проб води, які не відповідають нормативам за мікробіологічними показниками, в Україні за період 2020–2024 рр.

Ймовірно, це пояснюється наявністю у комунальних системах водопостачання повного циклу водопідготовки та регулярного знезараження. Основною причиною вищого рівня забруднення за мікробіологічними показниками сільських водопроводів може бути застарілість очисних споруд, відсутність належного технічного обслуговування та недостатня глибина залягання водоносних горизонтів, що піддаються антропогенному впливу.

На рисунку 3.4 наведено результати мікробіологічного дослідження проб води із різних джерел водопостачання у Волинській області протягом 2020–2024 рр. за показниками питомої ваги (у %) кількості проб води, що не відповідають нормам за мікробіологічними показниками. Як видно із наведених даних, найменшу кількість відхилень від нормативів спостерігаємо у комунальних водопроводах (0,07–0,7%), порівняно з аналогічними показниками в країні (2,3–5,4%), а також порівняно з іншими об’єктами водопостачання у Волинській області, наприклад, сільські водопроводи (4,29–11,4%) (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Питома вага проб води, що не відповідають нормативам за мікробіологічними показниками, у Волинській області (2020–2024 рр.)

Тенденція до зростання питомої ваги нестандартних проб у досліджуваній період особливо помітно спостерігається у 2022–2023 роках, що може бути пов'язано з дестабілізацією екологічної ситуації внаслідок воєнних дій та погіршенням роботи очисних каналізаційних систем. Найбільш негативна динаміка питомої ваги відмічена у пробах води з колодязних шахт 39,9 % (2023 р.) і 27 % (2024 р.), сільських водопроводів 4,29 % (2021 р.) і

11,4 % (2024 р.), а також і у артезіанських свердловинах 11,14 % (2022 р.) і 9,3 % (2023 р.).

Таким чином, проведений аналіз мікробіологічного забруднення водних об'єктів та систем водопостачання в Україні й Волинській області протягом 2020–2024 рр. засвідчив, що *E. coli* залишається важливим індикатором фекального забруднення та санітарного стану водного середовища. Встановлено загальнонаціональну тенденцію до зростання питомої ваги нестандартних проб води відкритих водойм, що вказує на важливість цієї проблеми. У третині досліджених проб води із рекреаційних водних об'єктів Волинської області зафіксовано перевищення гранично допустимого рівня кишкових паличок, що, в першу чергу, є свідченням про скиди у них недостатньо очищених стічних вод.

Аналіз якості питної води показав, що найгірші мікробіологічні показники стабільно характерні для сільських водопроводів і колодязів, тоді як комунальні системи водопостачання демонструють найкращу відповідність нормативам, що очевидно зумовлено наявністю повного циклу підготовки та знезараження води. Збільшення питомої ваги нестандартних проб води у період 2022–2023 рр., ймовірно, пов'язане з погіршенням екологічної ситуації та порушенням функціонування очисних споруд унаслідок воєнних дій.

Отже, отримані результати свідчать про необхідність подальшого систематичного моніторингу мікробіологічних показників води, як абіотичного об'єкту довкілля, особливо за показником індексу кишкової палички, з метою стабілізації санітарного стану водних ресурсів і зниження ризиків для здоров'я населення.

3.3. Порівняльна характеристика ізолятів *E. coli*, виділених із різних епідемічних та епізоотичних джерел

У роботі провели порівняльну оцінку трьох штамів *E. coli*, виділених із різних епідемічних та епізоотичних джерел (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Характеристика штамів *E. coli*, виділених із різних епідемічних та епізоотичних джерел

Умовне позначення штаму	Джерело походження штаму	Ентеропатогенність за:	
		β-гемолітичністю	Патогенністю для білих мишей
К-ЕК	Змив з поверхні шкіри	Немає	Немає
S-ЕК	Фекалії від хворого на набрякову хворобу поросяти	β-гемолітичний	Патогенний
В-ЕК	Фекалії від хворого на колібактеріоз теляти	Немає	Патогенний

Ізолят *E. coli* (К-ЕК) був виділений із змиву з поверхні шкіри і не мав ентеропатогенних властивостей. Другий ізолят (S-ЕК) – із кишечника трупа поросяти віком 2 місяці, яка загинула від набрякової хвороби, був ентеропатогенним і мав виражені β-гемолітичні властивості. Третій ізолят (В-ЕК) – був виділений із фекалій хворого на колібактеріоз теляти і мав ентеропатогенні властивості, що було підтверджено біологічною пробою на білих мишах.

3.3.1. Мікроскопічне дослідження штамів

Мікробні клітини всіх трьох штамів мали паличкоподібну форму, завдовжки близько 1,5–4 μm і шириною 0,5–0,8 μm, з заокругленими кінцями,

були рухливими та не утворювали спор чи капсул. У мазках клітини розташовувались поодинокі або парами. При фарбуванні за Грамом усі штами були грамнегативними (рис. 3.5).

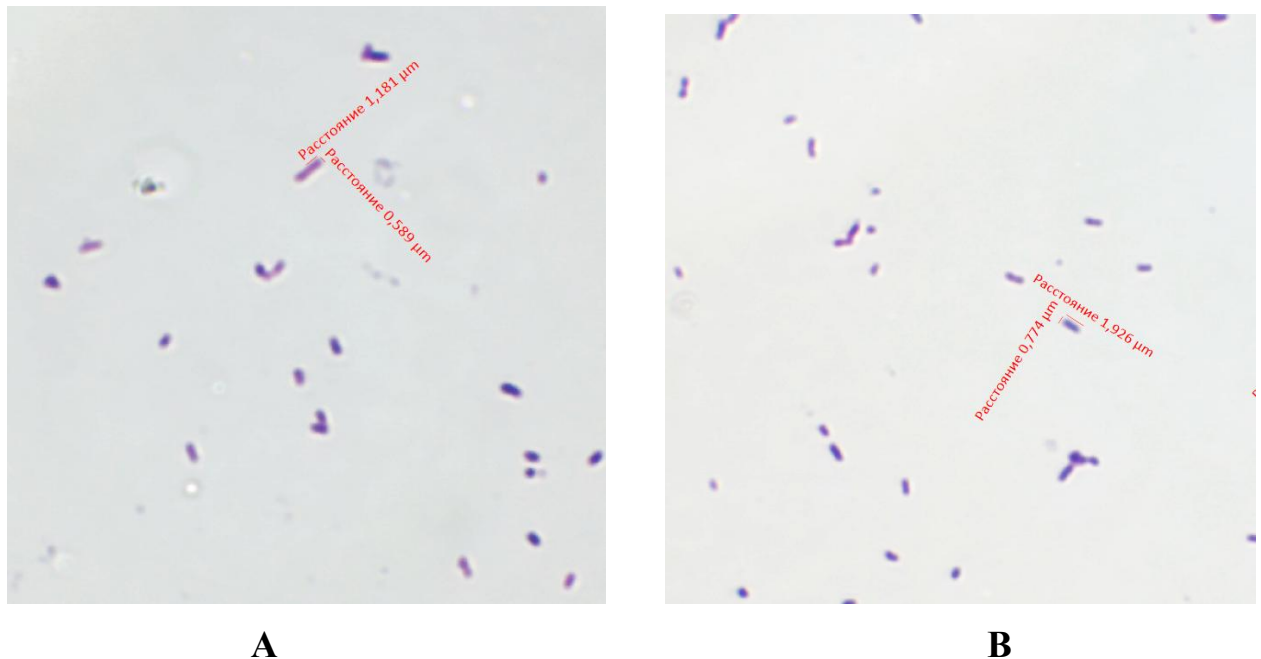


Рис. 3.5. 18-годинні бульйонні культури двох штамів *E. coli* : А – S-ЕК; В – В-ЕК (фарбування за Грамом; збільшення $\times 1000$).

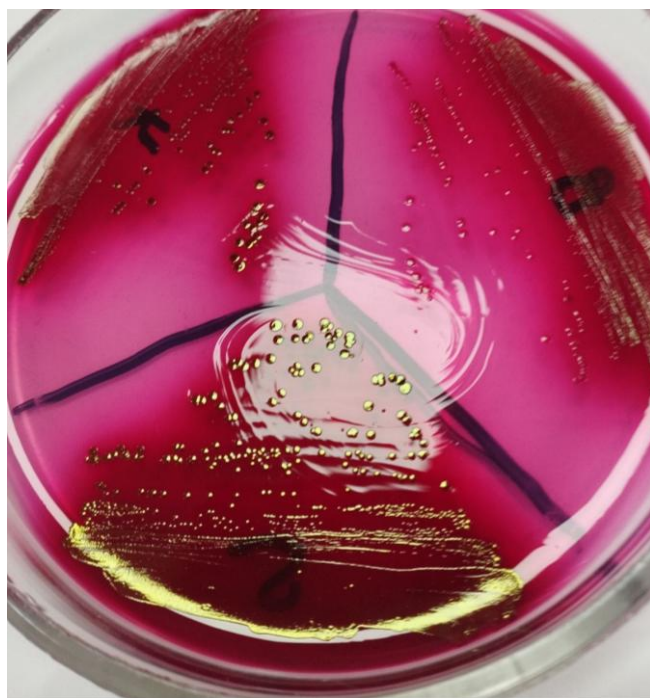
Аналізуючи мікроскопічну картину, представлену на рисунку 3.5, можна відзначити, що виявити відмінності у морфологічних ознаках та тинкторіальних властивостях цих штамів неможливо.

3.3.2. Опис культур досліджуваних штамів на поживних середовищах

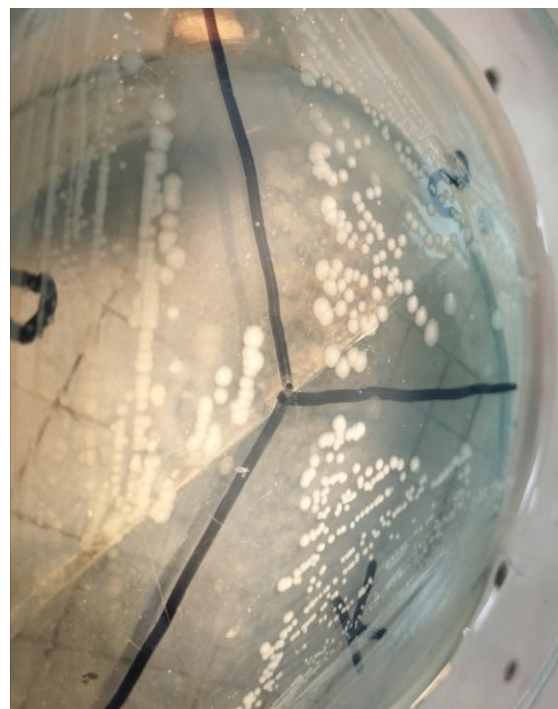
Досліджувані штами *E. coli* у МПБ утворювали густу каламуть з пристінковим кільцем на поверхні бульйону; після тривалого відстоювання культури осідали на дно.

На МПА всі три штами *E. coli* формували середнього розміру (до 2 мм) круглі, опуклі, прозорі колонії з рівними краями (рис. 3.6, В).

На Ендо-агарі штами кишкової палички давали характерні темно-червоні колонії з металевим блиском, округлі й опуклі з рівними краями (рис. 3.6, А).



А



В

Рис. 3.6. 24-годинні культури трьох штамів *E. coli* на: А – Ендо і В – МПА.

На середовищі Левіна всі штами утворювали темно-фіолетові колонії з металевим блиском, також округлі й опуклі.

Загалом, культуральні властивості всіх трьох штамів були типовими для *E. coli*. Таким чином, за культуральними властивостями диференціювати штами кишкової палички, отримані з різних джерел, не можливо.

3.3.3. Дослідження біохімічних властивостей штамів *E. coli*

Вивчення біохімічних властивостей всіх трьох штамів *E. coli* проводили на строкатому або так званому кольоровому ряді та з допомогою набору Rapid ID32 E.

Використання кольорового ряду дозволяє оцінити основні протеолітичні, цукролітичні та окисно-відновні властивості штамів *E. coli*.

Нами встановлено, що протеолітичні властивості всіх трьох штамів *E. coli* є слабо вираженими. Зокрема, вони не розріджують желатин, не утворюють сірководню, не використовують цитрат як джерело вуглецю, однак утворюють індол. Таким чином, між штамами не виявлено значних відмінностей за протеолітичними властивостями.

При виконанні реакції Фогеса-Проскауера у трьох досліджених культурах колір розчину залишався жовтим, що свідчить про відсутність утворення ацетоїну, а отже і негативну реакцію Фогеса-Проскауера.

Реакція з метиленовим червоним дала позитивний результат у всіх трьох досліджуваних штамів.

Цукролітичні властивості всіх трьох штамів *E. coli* були більш вираженими порівняно із протеолітичними. Всі штами ферментували глюкозу і лактозу з утворенням кислоти і газу, маніт, мальтозу, сахарозу та арабінозу з утворенням кислоти. Однак, серед штамів не було виявлено якихось біохімічних відмінностей, що могли б служити маркерами для їх внутрішньовидової ідентифікації.

На середовищі Левіна всі три штами набули темно-фіолетового забарвлення, що свідчить про їх здатність ферментувати лактозу.

На цитратному агарі Сімонса культури кишкової палички не проросли, середовище не змінило кольору і залишилось зеленим, що вказує на нездатність штамів метаболізувати цитрат.

Гемолітичні властивості на кров'яному агарі виявив лише патогенний штам S-EK, виділений від поросяти.

Отже, серед класичних мікробіологічних методів визначення біохімічних і цукролітичних властивостей лише посів на кров'яний агар мав диференційне значення, оскільки дозволив виявити β -гемолітичний штам *E. coli*.

3.3.4. Дослідження біохімічних властивостей штамів *E. coli* за допомогою набору Rapid ID32 E

Застосування набору Rapid ID32 E для вивчення біохімічних властивостей дало можливість виявити окремі відмінності у досліджуваних штамів *E. coli* (див. табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Біохімічні властивості досліджуваних штамів *E. coli* за допомогою набору Rapid ID32 E

Реакція/фермент	Досліджувані штами <i>E. coli</i>		
	К-ЕК	В-ЕК	S-ЕК
Уреаза	+	-	-
Лізинкарбоксилаза	+	+	+
Орнітиндекарбоксилаза	-	-	-
Гідроліз ескулін-заліза цитрату	+	-	-
Утилізація D -Глюкози	+	+	+
Утилізація L-арабінози	+	+	+
Утилізація адоніолу	+	+	+
Утилізація L-рамнози	+	+	+
Утилізація D-маніту	+	+	+
Утилізація D-сорбіту	+	+	+
Утилізація D-целобіози	+	-	-
Утилізація D-мелібіози	+	+	+
Утилізація натрію глюкоронату	+	+	-
Утилізація D-маннози	+	+	+
Утилізація D-мальтози	+	+	+
Утилізація D-трегалози	+	+	+
Утилізація малонату натрію	+	-	-
Парафеніланін-деаміназа	-	-	-
Утилізація D-сахарози	+	+	-
Утилізація калію 5-кетоглюконату	+	+	+
Утилізація палатинози	+	+	+
Утилізація галактуранової кислоти	+	+	-
Утилізація Колістин	+	+	+
Утилізація Кумарат	+	+	+

Продовження таблиці 3.3

Тетратионатредуктаза	+	+	+
Утилізація 2-нітрофеніл-N-ацетил- β D-галактопіранозид	-	-	-
Утилізація 4-нітрофеніл- β D-галактопіранозид	+	+	+
α -галактозидаза	-	-	-
Індоксилофосфат	-	-	-
Утилізація D-рафінози	+	+	-

Як свідчать результати досліджень, представлені у таблиці 3.3, культура зі змиву (штам К-ЕК) продемонструвала наявність уреазу, здатність до гідролізу ескуліну, а також утилізацію елементів, таких як залізо цитрату, D-целобіоза та натрій малонат.

Ентеропатогенний штам (В-ЕК), виділений від теляти, не утилізував D-целобіозу та натрій малонат, а також не утворював уреазу (рис. 3.7).



Рис. 3.7. Стрипи з реагентами та позначеними результатами реакції для кожного із досліджуваних штамів *E. coli*

Як показали дослідження, цей метод дозволяє виявляти відмінності в біохімічних властивостях штамів і використовувати ці відмінності для їх диференціації.

3.3.5. Дослідження антибіотикорезистентності штамів *E. coli*

Антибіотикорезистентність штамів визначали шляхом вимірювання зон затримки росту на чашках Петрі з дисками антибіотиків.

Було встановлено, що β -гемолітичний штам S-EK чутливий до котримазину, амікацину, карбеніциліну, ципрофлоксацину, стрептоміцину, тетрацикліну, фурадоніну, норфлоксацину, амфотерицину В, нетроміцину, цефоперазону, доксицикліну, сульфаметоксазолу, тіамуліну, азитроміцину. Водночас штам виявився резистентним до канаміцину, фурагіну, інтраконазолу, кетоконазолу, кларитроміцину, флуконазолу, ванкоміцину, еритроміцину та нітрофуратоніну.

Коменсальний штам K-EK виявив резистентність до нітрофуратоніну, котримазину, амікацину, карбеніциліну, стрептоміцину, амфотерицину В, фурагіну, кларитроміцину, інтраконазолу, кетоконазолу, доксицикліну, тіамуліну, флуконазолу, азитроміцину, ванкоміцину та еритроміцину. Водночас він був чутливий до канаміцину, ципрофлоксацину, тетрацикліну, фурадоніну, норфлоксацину, нетроміцину, цефоперазону та сульфаметоксазолу.

Ентеропатогенний штам В-EK, виділений від теляти, виявився не чутливим до нітрофуратоніну, котримазину, амікацину, карбеніциліну, стрептоміцину, амфотерицину В, кларитроміцину, інтраконазолу, кетоконазолу, доксицикліну, сульфаметоксазолу, флуконазолу, ванкоміцину та еритроміцину, і, в той же час, чутливим до канаміцину, ципрофлоксацину, тетрацикліну, фурадоніну, норфлоксацину, фурагіну, нетроміцину, цефоперазону, тіамуліну та азитроміцину.

Як показали результати наших досліджень, зниження резистентності штамів до антибіотиків спостерігається в міру збільшення їх патогенності – чим вища патогенність штаму, тим нижча його стійкість до антибіотиків. Це явище можна пояснити тим, що бактерії, адаптуючись до паразитичного способу життя, втрачають низку ферментів, що робить їх більш чутливими до антибактеріальних засобів.

3.3.6. Дослідження біологічних властивостей різних штамів *E. coli*

Усі штами *E. coli* були досліджені в біологічній пробі на клінічно здорових білих мишах живою масою 14-16 г. На кожен ізолят брали по три білі миші. Зараження мишей проводили внутрішньоочеревинно. При цьому були отримані такі результати.

Коменсальний штам К-ЕК не спричинив загибелі жодної із трьох інфікованих ним білих мишей.

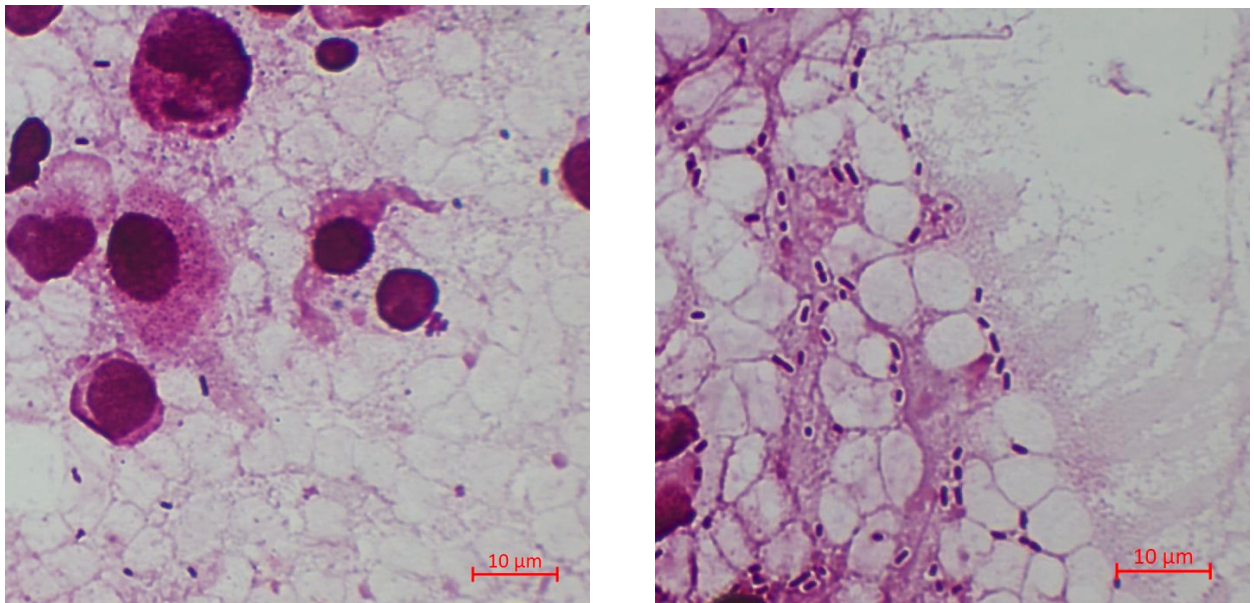
Ентеропатогенний штам В-ЕК, виділений від теляти, спричинив смерть всіх трьох мишей через 16–17 годин. Трупне заклякання було слабо виражене, шкіра на черевній та грудній стінках набула синюватого відтінку. Під час огляду паренхіматозних органів виявлено значне кровонаповнення печінки та нирок, збільшення селезінки – вона мала темно-вишневий колір та затуплені краї; кишечник мав гомогенну консистенцію з жовтим вмістом. Кожний паренхіматозний орган (серце, легені, печінка, селезінка, нирки, ділянка кишечника) був відібраний і поміщений у стерильні чашки ізольовано для подальшого бактеріологічного дослідження (рис. 3.8). З кожного органу робили мазки відбитки на добре знежирених предметних скельцях, підсушували, фіксували на полум'ї спиртівки і фарбували за Грамом.



Рис. 3.8. Ізольовані паренхіматозні органи білої миші, яка загинула від інфікування ентеропатогенним штамом (В-ЕК) *E. coli*

β -гемолітичний штам S-ЕК спричинив смерть всіх трьох мишей через 18–19 годин. Трупне залякання було слабо виражене, шкіра на черевній та грудній стінках набула синюватого відтінку, а шерсть була забруднена слідами кривавої діареї. Спостерігалось сильне кровонаповнення печінки та нирок, потовщення селезінки, яка мала темно-вишневий до чорного колір, а товстий відділ кишечника знаходився в стані геморагічно-катарального запалення.

У мазках-відбитках із паренхіматозних органів, пофарбованих за Грамом, виявлено поліморфні грамнегативні палички (рис. 3.9.).



А

В

Рис. 3.9. Мікроскопія мазків-відбитків із паренхіматозних органів білої миші, яка загинула від інфікування ентеропатогенним штамом (S-EK) *E. coli*; А – селезінка; В – легені (фарбування за Грамом, $\times 1000$).

З усіх органів та кишечника трупів білих мишей було виділено чисті культури кишкової палички, що свідчить про септичну форму колібактеріозної інфекції, спричиненої обома штамми, і що обидва штамми є ентеропатогенними.

3.4. Одержання та застосування мічених ФІТЦ видоспецифічних ешерихіозних глобулінів

3.4.1. Порівняльна оцінка схем імунізації та підбір тварин-донорів для отримання імунних ешерихіозних сироваток

Для успішної індикації та ідентифікації ентеротоксигенних штамів кишкової палички з допомогою реакції імуофлуоресценції необхідно, щоб імунні сироватки проти поверхневих антигенів *E. coli* володіли високою активністю та специфічністю. Отримати такі сироватки можливо за старанного підбору тварин-донорів та ефективних схем імунізації.

Для імунізації тварин-донорів використали вакцинний препарат, який представляв собою 5-мільярдну суспензію мікробних клітин 24-годинної культури ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli* на триптон-соевому дріжджовому бульйоні; інактивацію культури провели формальдегідом (0,4% до об'єму культури), а концентрування – аеросилом А-300 з розрахунку 3 мг на 1 мл культури. До інактивації культура представляла собою рухливі поліморфні типи для *E. coli* грамнегативні палички.

Як тварин-донорів використали кролів породи шиншила віком 6 міс., масою $3 \pm 0,3$ кг; баранів породи прекос віком $6 \pm 0,5$ міс.; бугаїв віком 6 міс.; коней віком $2 \pm 0,5$ роки. Всі тварин були середньої вгодованості, клінічно здорові. Від кожного виду тварин брали по 6 голів, підібраних за принципом аналогів (за віком, живою масою та однаковими умовами утримання, догляду та годівлі).

Схеми імунізації тварин різнилися між собою за кількістю ін'єкцій антигену та його дозою, а також датою забору крові для дослідження на вміст аглютининів у сироватці крові імунізованих тварин (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Схеми імунізації тварин-донорів вакцинним препаратом, виготовленим із ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli*

Вид тварин	Перша схема імунізації				Друга схема імунізації				
	Доба імунізації				Доба імунізації				
	Доза антигену, в см ³				Доза антигену, в см ³				
	1-а	5-а	9-а	30-а	1-а;	5-а;	9-а;	13-а;	34-а;
Коні	2,5	5,0	10,0	забір*	1,0	2,0	5,0	10,0	забір**
ВРХ	2,5	5,0	10,0	забір	1,0	2,0	5,0	10,0	забір
Вівці	1,0	2,0	4,0	забір	0,5	1,0	2,0	4,0	забір
Кролі	0,5	1,0	2,0	забір	0,5	1,0	2,0	4,0	забір

Примітка: * – забір крові від тварин донорів проводили на 30-у добу після початку імунізації тварин;

****** – забір крові від тварин донорів проводили на 34-у добу після початку імунізації тварин.

Так, за першої схеми імунізації вакцинний препарат вводили підшкірно триразово, а за другої – чотириразово, з інтервалом 4 доби у 2-кратно зростаючих дозах. Початкова і наступні дози антигену для кожного виду тварин були різними (табл. 3.4). Забір крові для дослідження на вміст аглютининів у сироватці крові проводили на 21-у добу після останнього уведення вакцинного препарату або на 30-у добу після початку імунізації (перша схема імунізації) та на 34-у добу після початку імунізації (друга схема імунізації).

Рівень аглютининів у сироватці крові досліджуваних груп тварин визначали у розгорнутій реакції аглютинації (РА). Результати досліджень наведені у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Порівняльна оцінка титрів аглютининів у сироватці крові різних видів тварин – потенційних донорів імунних ешерихіозних сироваток, імунізованих за двома схемами вакцинним препаратом, виготовленим із ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli* ($p \leq 0,05$)

Схема імунізації	Вид тварин (n=6) та титри аглютининів			
	Коні	ВРХ	Вівці	Кролі
Перша	1:5973 $\pm$ 1428	1:4267 $\pm$ 540	1:5547 $\pm$ 1028	1:7253 $\pm$ 1389
Друга	1:6827 $\pm$ 1079	1:4693 $\pm$ 427	1:8533 $\pm$ 1079	1:9387 $\pm$ 853

Наведені у табл. 3.4 дані свідчать про те, що на один і той же вакцинний препарат (антиген) імунна система різних видів тварин реагує по-різному. Так, найвищі титри аглютининів спостерігали у сироватці крові кролів – 1:7253 $\pm$ 1389 (перша схема імунізації) і 1:9387 $\pm$ 853 (друга схема), дещо нижчі ці показники були у коней (1:5973 $\pm$ 1428 і 1:6827 $\pm$ 1079, відповідно) і овець

(1:5547 $\pm$ 1028, 1:8533 $\pm$ 1079) і найнижчі у великої рогатої худоби (1:4267 $\pm$ 540, 1:4267 $\pm$ 540). Результати цього досліджу вказують на те, що підбір тварин-донорів з метою отримання високо активних імунних сироваток має важливе значення. Проте, зважаючи на низку факторів і, в першу чергу, на доступність як тварин-донорів, у подальших наших дослідженнях з отримання імунних ешерихіозних сироваток для виготовлення імунофлуоресцентного діагностичного ми обрали бугаїв.

Дані таблиці 3.5 свідчать про те, що рівні антитіл у сироватці крові імунізованих тварин за різних схем їх імунізації однотипним антигенним препаратом достовірно різняться між собою. Так, ця різниця у рівнях антитіл між другою і першою схемами імунізації в овець становить 35 %, у кролів – 22,8 %, в коней – 12,5 % і ВРХ – 9,1 %. Очевидно, що четверте введення вакцинного препарату підсилило гуморальну відповідь у тварин, імунізованих за другою схемою, порівняно із першою. Можна стверджувати, що збільшення кількості ін'єкцій антигену позитивно впливає на зростання титрів аглютининів.

Проте, слід відзначити, що у всіх імунізованих коней і кролів, а також у половини взятих у дослід бугаїв і баранів четверте введення вакцинного препарату спричинило підвищення страху перед введенням препарату – тварини збуджено реагували на їх фіксацію, тремтіли. У тварин цієї групи на місці введення препарату утворилась розлита припухлість, спостерігалось місцеве підвищення температури і болючість, які зникали поступово впродовж 6–8 діб. Ці ознаки є свідченням того, що у тварин вже після третього введення вакцинного препарату у зростаючих дозах спостерігається сенсibilізація організму антигенними детермінантами, що входили до складу вакцинного препарату.

Зважаючи на те, що четверте введення препарату призводить до стресового стану організму імунізованих тварин як на імунологічному (розвиток сенсibilізації), так і на невротичному (розвиток боязні до

проведення ветеринарних процедур, в т. ч. й ін'єкцій), ми вважаємо, що для отримання високоактивних сироваток достатньо триразового уведення вакцинного препарату.

3.4.2. Отримання імунних ешерихіозних сироваток

Як тварин-донорів в цьому досліді використали бугаїв голштино-фризької породи віком 6–7 місяців, середньої вгодованості, клінічно здорових. На кожний вакцинний препарат брали по 6 клінічно здорових бугаїв, підібраних за принципом аналогів (за віком, живою масою та однаковими умовами утримання, догляду та годівлі).

Вакцинні препарати для імунізації тварин готували із ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli*, виділеного від трупа поросяти, яке загинуло від набрякової хвороби – інфекційної хвороби поросят 1,5–2-місячного віку, що спричиняється ентеротоксигенною β -гемолітичною кишковою паличкою і характеризується блискавичним перебігом та ентеротоксичною формою, яка проявляється надгострим дифузним серозно-геморагічним колітом, загальною інтоксикацією організму та набряками підшкірної клітковини повік, лобної частини черепа та піднижньощелепового простору. Штам був виділений і представлений нам спеціалістами бактеріологічного відділу лабораторії Держпродспоживслужби Волинської області. З цього штаму було виготовлено два вакцинних препарати – один містив інактивовані формальдегідом мікробні клітини *E. coli*, які зберегли всі властиві їм поверхневі антигенні детермінанти – H-, K-, F- та O-антигени, а також анатоксин кишкової палички.

Другий вакцинний препарат представляв собою соматичний O-антиген *E. coli*.

Перший вакцинний препарат (1-а дослідна група тварин-донорів) – це 5-мільярдна суспензія мікробних клітин 18-годинної культури тест-штаму на

ТСДБ, інактивованих формальдегідом (0,4% до об'єму культури), концентрованих аеросилом А-300 (3 мг/мл). Мікроскопічно (до інактивації формаліном) культура представляла собою поліморфні рухливі грамнегативні палички розміром $08-1 \times 2-5$ мкм.

Другий вакцинний препарат (2-а дослідна група тварин-донорів) – це також 5-мільярдна суспензія мікробних клітин 24-годинної культури тест-штаму на ТСДБ, інактивованих кип'ятінням упродовж 1,5 год, концентрованих центрифугуванням за 4000 об/хв протягом 20 хв із додаванням аеросилу А-300 з розрахунку 3 мг/мл.

Для отримання імунних сироваток тваринам-донорам тричі з інтервалом 4 доби внутрішньом'язово вводили по 2,5 мл (перше уведення), по 5 мл (друге уведення) та по 10 мл (третє уведення) вакцинних препаратів.

Для оцінки динаміки цитоморфологічних показників крові тварин-донорів в процесі їх імунізації двома різними вакцинними препаратами від бугаїв періодично брали по 10 мл нестабілізованої крові та по 5 мл стабілізованої гепарином крові. Забір крові проводили в перший день імунізації, на 9-у і на 30-у добу. Результати дослідження представлені у таблиці 3.6.

Таблиця 3.6

Динаміка цитоморфологічних показників крові тварин-донорів в процесі їх імунізації двома вакцинними препаратами із β -гемолітичного штаму *E. coli* (n=6; p<0,01)

Група тварин	Вміст гемоглобіну, г/л		
	До імунізації	На 9-й день	На 30-й день
1-а	99,7 $\pm$ 4,4**	104,7 $\pm$ 4,6	106,7 $\pm$ 4,1
2-а	101,8 $\pm$ 3,6	102,0 $\pm$ 4,2	104,8 $\pm$ 4,0
Вміст еритроцитів, млн/мкл			
	До імунізації	На 9-й день	На 30-й день
1-а	7,2 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,1
2-а	7,4 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1

Продовження таблиці 3.6

Вміст лейкоцитів, тис/мкл			
	До імунізації	На 9-й день	На 30-й день
1-а	8,5±0,1	9,1±0,2	9,6±0,2
2-а	8,5±0,1	9,0±0,2	9,0±0,2

Примітка: ** – $p < 0,05$.

З даних, наведених у таблиці 3.6, видно, що показники вмісту гемоглобіну в крові обох груп тварин достовірно не змінилися за період імунізації.

У той же час, у динаміці вмісту лейкоцитів спостерігаємо достовірне ($p < 0,01$) зростання їх кількості у тварин як першої, так і другої груп, що вказує на імунобіологічну перебудову організму вакцинованих тварин на кінець досліджу. Так, приріст кількості лейкоцитів у тварин, імунізованих першим вакцинним препаратом, в якому завдяки обробці формальдегідом культури кишкової палички зберігся весь комплекс поверхневих антигенів *E. coli*, становив 12,9%, тоді як у тварин другої групи, імунізованих вакцинним препаратом, мікробні клітини якого являли собою лише соматичний О-антиген кишкової палички, приріст становив лише 5,9%. Цей факт свідчить про те, що перший вакцинний препарат мав більший стимулюючий вплив на лейкопоез, ніж другий. Про це також свідчать показники динаміки рівнів еритроцитів у крові імунізованих тварин. Так, приріст вмісту еритроцитів на кінець досліджу у тварин першої групи становив 12,5%, а у тварин другої групи – 6,8%. Очевидно, що перший препарат мав вищий стимулюючий вплив не лише на лейкопоез, який є показником клітинного імунітету організму, але й в цілому на гемопоез.

Про рівень стимулюючого впливу обох видів препаратів, виготовлених із одного штаму *E. coli*, можна судити й за іншими показниками, зокрема динамікою білкового профілю сироватки крові тварин-донорів (табл. 3.7).

Аналіз динаміки білкового профілю сироватки крові обох груп тварин вказує на те, що на фоні достовірного ($P<0,01$) зниження альбумінів у дослідних тварин на кінець імунізації ($38,7\pm1,5$ у тварин 1-ї групи і $38,2\pm1,1$ у тварин 2-ї групи) із показниками вмісту альбумінів на початку імунізації ($47,0\pm1,3$ – 1-а група; $46,2\pm1,3$ – 2-а група) на 9,4%, спостерігаємо зростання рівня фракції γ -глобулінів у дослідних тварин обох груп (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

**Динаміка показників білкових фракцій сироватки крові тварин-донорів
в процесі їх імунізації двома вакцинними препаратами
із β -гемолітичного штаму *E. coli* ($M\pm m$; $n=6$; $P<0,01$)**

Група тварин	Альбуміни, г/л	Глобуліни, г/л				Співвідношення А/Г
		α	β	γ	Σ	
У 1-ий день до уведення вакцинних препаратів						
Перша	47,0±1,3	12,8±1,1	11,2±1,6	29,0±1,9	53,0	0,88
Друга	46,2±1,3	13,0±1,3	11,8±1,3	29,0±1,3	53,8	0,86
На 9-ий день після початку імунізації						
Перша	43,2±1,2	12,2±0,7	12,2±0,7	32,5±0,5	56,8	0,76
Друга	41,7±0,7	13,2±0,7	13,2±0,8	32,0±0,8	58,3	0,72
На 30-ий день після початку імунізації						
Перша	38,7±1,5	11,5±0,5	9,5±0,5	40,3±1,8	61,3	0,56
Друга	38,2±1,1	12,7±0,9	11,5±1,4	37,7±1,1	61,8	0,63

Найпомітніший цей приріст ($40,3\pm1,8$) відзначаємо у тварин 1-ї групи, яких імунізували препаратом, що містив весь комплекс антигенів мікробної клітини кишкової палички. В той же час зростання γ -глобулінової фракції у тварин, імунізованих препаратом, що містив лише О-антиген, було дещо меншим і становило $37,7\pm1,1$. Приріст γ -глобулінової фракції сироваткових білків у кінці періоду імунізації свідчить про те, що обидва вакцинних препарати мали стимулюючий вплив не лише на гемопоез і лейкопоез, але й на білковий профіль сироваткових білків, зокрема на приріст γ -глобулінів і зниження рівня альбумінової фракції. Очевидно, що комплексний антиген

першого вакцинного препарату мав вищий антигенний вплив на імунну систему організму в цілому і на її гуморальний імунітет зокрема.

Про це свідчать результати імунологічного дослідження сироватки крові на вміст аглютининів до поверхневих антигенів *E. coli*.

У таблиці 3.8 наведено показники динаміки вмісту аглютининів у сироватці крові тварин-донорів в процесі їх імунізації вакцинними препаратами, виготовленими із різних антигенів ентеротоксигенної кишкової палички.

Таблиця 3.8

Динаміка титрів аглютининів у сироватці крові бугаїв в процесі їх імунізації двома вакцинними препаратами, виготовленими із антигенів ентеропатогенного штаму *E. coli* ($M \pm m$; $n=6$; $P<0,1$)

Тварини-донори	Середньоарифметичний титр антитіл у РА на:		
	1-у добу	9-у добу	30-у добу
1-ї групи	1:11,7 $\pm$ 2,8	*1:373 $\pm$ 91	*1:2987 $\pm$ 573**
2-ї групи	1:5,8 $\pm$ 2,0	*1:120 $\pm$ 11 ↓	*1:800 $\pm$ 160**↓

Примітка: * – $p \leq 0,05$ при порівнянні показників 1–9 чи 1–30 діб у межах групи тварин; ** – $p \leq 0,05$ при порівнянні показників 9–30 діб у межах групи тварин. ↓ – достовірно нижчий показник ($p \leq 0,05$) у досліджуваних тварин другої групи, порівняно з першою.

Як видно з даних таблиці 3.8, у динаміці титрів антитіл спостерігаємо статистично достовірне наростання рівнів аглютининів. Найвищий приріст аглютининів спостерігаємо у сироватці крові бугаїв першої групи. Так, рівень антитіл на початку імунізації становив 1:11,7 $\pm$ 2,8, а на 30-у добу – 1:2987 $\pm$ 573. Подібну динаміку аглютининів у процесі імунізації спостерігаємо й у тварин другої групи – до початку введення вакцинного препарату середній титр становив 1:5,8 $\pm$ 2,0, тоді як на кінець імунізації – 1:800 $\pm$ 160.

Антигенна активність досліджуваних нами вакцинних препаратів мала не однаковий вплив не лише на рівень аглютининів, але й на бактерицидну активність сироватки крові, про що свідчать результати наших досліджень, які наведені на рисунку 3.10.

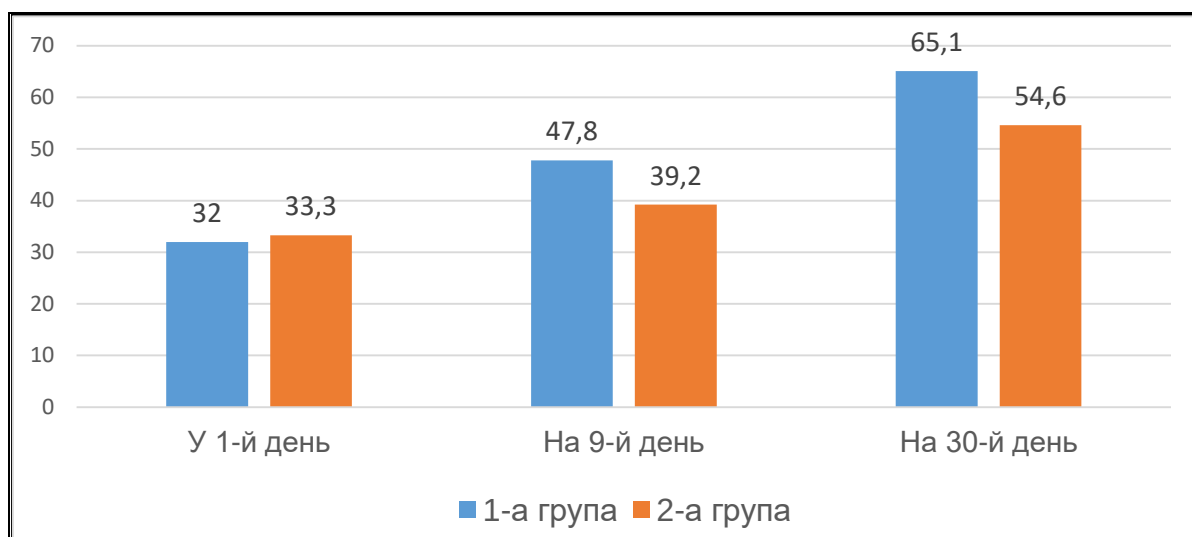


Рис. 3.10. Динаміка бактерицидної активності сироватки крові (у %) тварин-донорів, в процесі їх імунізації вакцинними препаратами із антигенів ентеропатогенного штаму *E. coli* ($M \pm m$; $n=6$; $P<0,01$).

Отже, поствакцинальна імунобіологічна перебудова проявляється не тільки змінами гуморальних показників імунітету, що добре видно при аналізі динаміки аглютинінів (табл. 3.8), але й динаміки бактерицидної активності сироватки крові (рис. 3.10).

Так, до початку імунізації бактерицидна активність сироватки крові тварин-донорів обох груп була майже однаковою і становила $32,0 \pm 1,0$ (перша група) і $33,3 \pm 1,1$ (друга група). Проте в ході імунізації тварин спостерігаємо зростання її активності. Так, на 9-й день імунізації вона зросла на 15,8 % (перша група) і на 5,9 % (друга група), а на 30-й день – на 33,1 % і на 22,6 %, відповідно. Отримані дані свідчать про те, що обидва вакцинні препарати спричиняють в організмі тварин-донорів імунобіологічну перебудову, яка характеризується, крім вище згаданого, ще й достовірним зростанням бактерицидної активності сироватки крові. При цьому рівень зростання цього показника був значно вищим у тварин першої групи, яких імунізували препаратом, що містив весь комплекс поверхневих антигенів кишкової палички.

Проведені нами дослідження фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу нейтрофілів тварин-донорів в процесі їх імунізації двома вакцинними препаратами підтвердили думку науковців про те, що коли вакцинний препарат стимулює гуморальну ланку імунітету, то при цьому буде спостерігатися його вплив і на клітинну ланку імунітету, зокрема на активність фагоцитозу. У таблиці 3.9 наведено результати цих досліджень.

Таблиця 3.9

Фагоцитарна активність (в %) та фагоцитарний індекс (кількість мікробних клітин на один нейтрофіл) нейтрофілів бугаїв у процесі їх імунізації двома вакцинними препаратами, виготовленими із різних антигенів *E. coli* ($M \pm m$; $n=6$; $P<0,05$)

Група тварин	Фагоцитарна активність та фагоцитарний індекс нейтрофілів на:					
	1-й день		9-й день		30-й день	
	ФА	ФІ	ФА	ФІ	ФА	ФІ
Перша	38 $\pm$ 2	5,0 $\pm$ 1,3	*71 $\pm$ 4	*9,7 $\pm$ 1,6	*54 $\pm$ 3**	6,8 $\pm$ 1,3
Друга	39 $\pm$ 2	4,3 $\pm$ 0,5	*50 $\pm$ 2 ↓	*7,8 $\pm$ 1,1 ↓	45 $\pm$ 3 ↓	6,5 $\pm$ 0,9

Примітка: ФА – фагоцитарна активність (у %); ФІ – фагоцитарний індекс (кількість мікробних клітин на один нейтрофіл). * – $p \leq 0,05$ при порівнянні показників 1–9 чи 1–30 днів у межах групи тварин; ** – $p \leq 0,05$ при порівнянні показників 9–30 днів у межах групи тварин. ↓ – достовірно нижчий показник ($p \leq 0,05$) у досліджуваних тварин другої групи, порівняно з першою.

Так, до початку імунізації активність фагоцитозу була майже однаковою в обох групах тварин і становила 38–39 $\pm$ 2% при фагоцитарному індексі 5,0 $\pm$ 1,3 (перша група) і 4,3 $\pm$ 0,5 (друга група). З даних табл. 3.8 бачимо, що вже після двох ін'єкцій вакцинних препаратів (9-й день імунізації) фагоцитарна активність, як і фагоцитарний індекс суттєво зросли, зокрема у тварин першої групи до 71 $\pm$ 4 % (ФА) і 9,7 $\pm$ 1,6 (ФІ), а у тварин другої групи до 50 $\pm$ 2% (ФА) і 7,8 $\pm$ 1,1 (ФІ). На 30-й день імунізації спостерігаємо зниження і як фагоцитарної активності нейтрофілів до 54 $\pm$ 3 % (перша група) і 45 $\pm$ 3% (друга група), так і фагоцитарного індексу до 6,8 $\pm$ 1,3 (перша група) і 6,5 $\pm$ 0,9% (друга група), що свідчить про те, що йде поступове повернення активності імунної системи до

вихідних параметрів як за фагоцитарною активністю нейтрофілів, так і за фагоцитарним індексом.

3.4.3. Оцінка активності та специфічності ешерихіозної сироватки

Отримані сироватки, специфічні до ОН-антигенів ентеропатогенних штамів *E. coli*, оцінювали за їхньою активністю та специфічністю в розгорнутій реакції аглютинації.

Для проведення реакції непрямої імунофлуоресценції застосовували суспензію, приготовану в 0,85%-му розчині натрію хлориду, що містить одноразово відмиті мікробні культури мікроорганізмів *E. coli* віком 8–14 годин. Кінцева концентрація мікробних тіл у цій суспензії має становити 250–500 тис./см³.

На ретельно знежирених предметних скельцях, розмічених восковим олівцем або маркером на 10–12 рівних ділянок, виконували 10–12 мазків із суспензії вегетативних клітин досліджуваних штамів. Мазки висушували на повітрі і фіксували за допомогою метанолу за кімнатної температури протягом 10 хвилин. Після цього на мазки наносили досліджувану сироватку в послідовних двократних розведеннях від 1:2 до 1:1024. Препарати витримували у вологій камері за 37 °С протягом 30 хвилин, потім відмивали проточною водою протягом 10 хвилин, підсушували фільтрувальним папером і наносили флуоресцентно мічені антивидові глобуліни в робочому розведенні 1:16. Другий етап інкубації здійснювали за тих же умов і тривалості, після чого препарати знову відмивали, підсушували та досліджували під люмінесцентним мікроскопом. Оцінку результатів виконували за чотирихрестовою системою.

Сироватки вважали активними, якщо вони проявляли позитивну реакцію аглютинації з антигенами гомологічного штаму *E. coli* у розведенні 1:640 і вище.

Для визначення активності використовували 2-мільярдну суспензію інактивованих мікробних тіл штаму S-EK, з якого готували вакцинні препарати для імунізації тварин-донорів. Для оцінки специфічності застосовували 2-мільярдні суспензії формалінізованих та двократно відмитих мікробних клітин 14–16-годинних культур інших штамів *E. coli*, виділених у процесі нашої роботи з інших джерел, а також аналогічно приготовлені суспензії клітин таких видів ентеробактерій як от *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, а також *Pseudomonas aeruginosa*.

Після змішування компонентів вміст планшетів ретельно перемішували, після чого інкубували за 37 °C протягом 4 год, а далі 18–20 год за кімнатної температури. Оцінку результатів реакції аглютинації здійснювали за загальноприйнятою шкалою, при цьому реакцію вважали позитивною, якщо вона оцінена не менше, ніж двома плюсами.

Із даних, наведених у таблиці 3.10, видно, що активність ешерихіозної сироватки до ОН-антигенів гетерологічних штамів *E. coli* є високою і в окремих штамів (h-2 і h-3) є майже такою як до ОН-антигену гомологічного штаму (табл. 3.5). Це є свідченням високої специфічності отриманої сироватки до поверхневих антигенів гетерологічних ентеропатогенних штамів кишкової палички.

Дані табл. 3.10 вказують також на те, що ешерихіозна сироватка містила аглютиніни і до ОН-антигенів гетерологічних видів бактерій. Зокрема, титр аглютинінів до ОН-антигенів *S. enteritidis* становив 1:64, *P. aeruginosa* – 1:32 та *P. vulgaris*, *C. freundii* і *S. marcescens* – 1:16.

Таблиця 3.10

**Активність та специфічність ешерихіозної сироватки до ОН-антигенів
гетерологічних штамів *E. coli* та деяких гетерологічних видів
ентеробактерій в реакції аглютинації**

Гетерологічні штами <i>E. coli</i>								Гетерологічні види ентеробактерій				
h -1	h -2	h -3	h -4	h -5	b-1	s-1	a-1	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>
:2048	:4096	:4096	:2048	:2048	:1024	:2048	:1024	:64	:16	:16	:16	:32

Примітка: **h-1... h-5** – штами *E. coli*, отримані від людей (β -гемолітичні); **b-1** – штам *E. coli*, отриманий від великої рогатої худоби (слабо β -гемолітичний); **s-1** – штам *E. coli*, отриманий від свиней (сильно β -гемолітичний); **a-1** – штам *E. coli*, отриманий від птиці (не гемолітичний); **:16... :4096** – граничні розведення досліджуваної ешерихіозної сироватки (титр), в яких РА була оцінена на 2+.

Цей факт, з одного боку, свідчить про те, що ОН-антигени *E. coli*, на які була отримана ешерихіозна сироватка, мають певну спорідненість із ОН-антигенами гетерологічних видів бактерій. З іншого боку, антитіла імунної ешерихіозної сироватки не є строго специфічними і можуть давати перехресні реакції із поверхневими бактеріальними антигенами гетерологічних видів.

3.4.4. Одержання видоспецифічних ешерихіозних сироваток

З метою усунення перехресних реакцій до чужорідних бактеріальних антигенів, а також для досягнення високої специфічності імунної ешерихіозної сироватки, тобто, щоб вона не містила антитіл до ОН-антигенів гетерологічних видів мікроорганізмів, сироватку адсорбували один раз 2-мільярдною суспензією двічі відмитих 0,85% розчином натрію хлориду інактивованих формаліном мікробних клітин 12-годинної культури

S. enteritidis. Культура на цей період культивування була у стадії активного росту і розмноження – мікробні клітини розташовувалися в основному попарно, активно рухалися (препарат «висяча крапля», фазово-контрастна мікроскопія). Адсорбування проводили за 37°C упродовж 30 хв. Після цього суміш сироватки із мікробною масою бактерій-адсорбентів центрифугували для осадження аглютинату бактерій. В розгорнутій РА визначали титр аглютинінів до ОН-антигенів гетерологічних штамів *E. coli* та ОН-антигенів гетерологічних видів бактерій. Результати дослідів наведені у таблиці 3.11.

Таблиця 3.11

Титри аглютинінів до ОН-антигенів гетерологічних штамів *E. coli* та штамів гетерологічних бактерій в РА після адсорбування імунної ешерихіозної сироватки суспензією мікробних тіл *S. Enteritidis*

Гетерологічні штами <i>E. coli</i>								Штами гетерологічних видів бактерій				
h-1	h-2	h-3	h-4	h-5	b-1	s-1	a-1	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>
:1024	:2048	:2048	:1024	:1024	:512	:1024	:512	1:2	0	0	0	0

Із даних таблиці 3.11 видно, що така процедура повністю позбавляла імунну ешерихіозну сироватку від неспецифічних аглютинінів. В той же час специфічна активність зменшилася лише на один порядок, тобто адсорбування суттєво не вплинуло на специфічну активність сироватки, але в той же час позбавило її від неспецифічних антитіл щодо чужорідних бактеріальних антигенів.

Приготування розчину глобулінів проти *E. coli*. Після досягнення високої видоспецифічності із ешерихіозної сироватки виділили загальну

глобулінову фракцію білків шляхом осадження насиченим розчином сульфату амонію.

До охолодженої до 0–4 °С ешерихіозної сироватки повільно, крапля за краплею, при постійному помішуванні додавали рівний об'єм охолодженого до 0–4 °С насиченого розчину сульфату амонію. Отриману суміш витримували за температури 0–4 °С протягом 1 год, після чого центрифугували при 7000 об/хв на холоді (2–4 °С). Надосадову рідину видаляли, а осад глобулінів розчиняли у дистильованій воді, охолодженій до 4 °С, і доводили до початкового об'єму неадсорбованої сироватки.

Процедуру переосадження глобулінової фракції сироватки насиченим розчином сульфату амонію повторили ще двічі. Після цього осад глобулінів розчиняли у мінімальному об'ємі 0,85 %-го розчину натрію хлориду з рН 7,2–7,4 до повного розчинення глобулінів, а отриманий розчин додатково центрифугували для видалення можливих механічних домішок.

Для усунення надлишку сульфату амонію з отриманого розчину глобулінів застосовували метод гелевої фільтрації.

Очищення розчину глобулінів від надлишку сульфату амонію методом гелевої фільтрації здійснювали на колонці, заповненій середньозернистим (G-50) сефадексом.

Підготовка колонки до роботи. Сефадекс замочували у високій склянці, наповненій дистильованою водою, за постійного перемішування. Для цього зважували сефадекс у кількості, що, з урахуванням набухання, забезпечує об'єм гелю 360–400 см³. Після цього частинки, що спливли, видаляли, а осад повторно суспендували у свіжій воді. Процедуру повторювали до тих пір, поки не перестали з'являться дрібні частинки. Після завершення процесу замочування сефадекс залишили на добу для повного набухання.

Заповнення колонки проводили суспензією набухлого сефадексу при закритому крані, забезпечуючи його однорідне осідання.

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

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

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

Наявність солей амонію у фракціях, що витікали, визначали реактивом Неслера.

Видоспецифічні ешерихіозні глобуліни, очищені від сульфату амонію розливали у стерильні поліетиленові чи скляні ампули об'ємом 2–5 см³. Ампули зберігали при температурі 2–4 °С.

3.4.5. Виготовлення флуоресціюючих ешерихіозних глобулінів

У розчині очищених ешерихіозних глобулінів визначали концентрацію білка за методом Лоурі.

З'єднання глобулінів із флуоресцеїну ізотіоціанатом (ФІТЦ) здійснювали шляхом приготування кон'югаційної суміші, що включала розчин глобулінів із концентрацією білка 15–25 мг/см³, 15 % карбонатного буфера із рН 9,5 до загального об'єму суміші, а також ФІТЦ, якого відважували з розрахунку 15 мг на 1 г білка глобулінів.

Спочатку ФІТЦ розчиняли у половині об'єму буфера для кон'югації, потім краплями при безперервному помішуванні додавали до розчину глобулінів. Посудину, де розчиняли ФІТЦ, двічі промивали залишком буфера. Кон'югаційну суміш постійно помішували на магнітній мішалці за кімнатної температури протягом 1 год, а потім – 16–18 год за температури 2–4 °С.

Для приготування карбонатного буфера готували 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, змішували розчини Na_2CO_3 і NaHCO_3 у співвідношенні 2:8.

Очищали мічені глобуліни від незв'язаного барвника методом гелевої фільтрації на колонці із сефадексом G-50.

Перед фасуванням мічених ешерихіозних глобулінів в стерильні пластикові еппендорфи по 1 мл ми встановили їх робоче розведення. Для цього на ретельно знежиреному предметному склі з тильного боку робили маркером вісім однакових полів (рис. 3.11), в кожне із яких наносили краплю суспензії мікробних клітин 12-годинної культури гомологічного штаму (*S-EK*) *E. coli* на МПА, розбавленої до концентрації $200 \pm 50 \times 10^3$ м.к./мл; препарати підсушували і фіксували на полум'ї спиртівки; на кожний сектор мікропрепарату наносили певне розведення мічених ешерихіозних глобулінів починаючи із найвищого розведення 1:256 і закінчуючи розведенням 1:2; мікропрепарат із нанесеними розведеннями глобулінів поміщали у вологій камері в термостат на 30 хв; після цього мікропрепарати відмивали протягом 10 хв у фізрозчині з рН 7,6, двічі замінюючи його; підсушували мікропрепарати на повітрі і розглядали під люмінесцентним мікроскопом; за робоче розведення мічених ешерихіозних глобулінів приймали розведення, яке було на один порядок нижчим від того крайнього розведення, що давало світіння мікробних клітин гомологічного штаму на 3–4 плюси.

Наприклад, у нашому випадку, провівши 10 повторів, ми встановили, що виготовлені нами ешерихіозні глобуліни показали діагностичне світіння на 3–

4 плюси у розведенні 1:64. У результаті робоче розведення глобулінів буде 1:32.

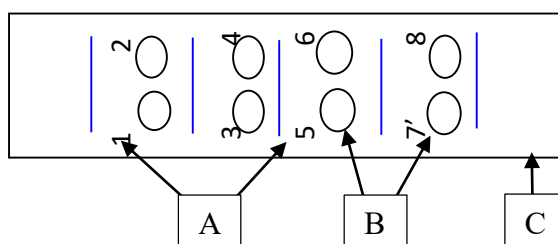


Рис. 3.11. Схематичне зображення мікропрепаратів з метою визначення робочого розведення мічених ешерихіозних глобулінів.

Умовні позначення: А – 1...8 – нумерація полів препарату; В – поля нанесення суспензії мікробних клітин тест-штаму; С – предметне скло.

Нами встановлено, що робоче розведення виготовлених нами мічених ешерихіозних глобулінів становило 1:16 (рис. 3.12, А).

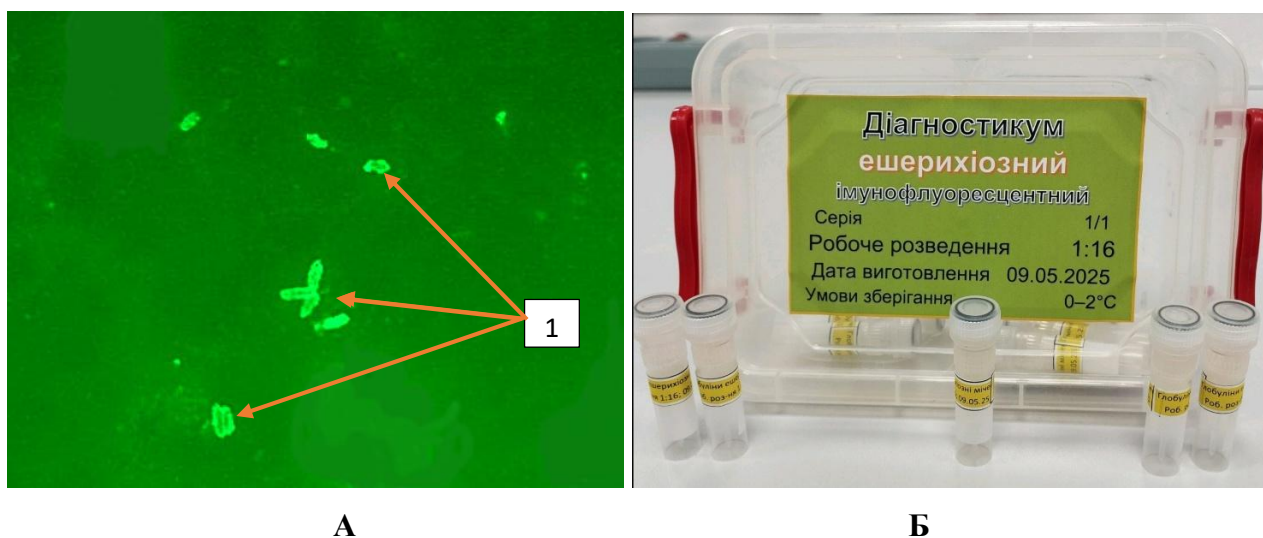


Рис. 3.12. А. Світіння на 4+ мікробних клітин тест-штаму *E. coli* (робоче розведення ешерихіозних глобулінів; $\times 1000$); Б. первинне і вторинне маркування діагностикуму «Мічені ешерихіозні глобуліни».

На розфасовані мічені ешерихіозні глобуліни наклеювали етикетки, на яких була вказано найменування діагностикуму, дата виготовлення, робоче

розведення, умови зберігання, дата наступної перевірки робочого титру (рис. 3.12, Б).

Зберігали еппендорфи із діагностикумом в спеціальній коробці за температури 0–4 °С.

3.4.6. Визначення оптимальних умов застосування мічених ешерихіозних глобулінів

У ході нашої роботи нами встановлено, що на результати реакції імунофлуоресценції можуть мати вплив ціла низка факторів, зокрема вік досліджуваної культури, метод фіксації препаратів, експозиція контакту мічених глобулінів з досліджуваним антигеном, спосіб відмивання мікропрепаратів.

Так, найбільш виражене специфічне світіння було у мікропрепаратах з 10–20-годинних культур на МПБ та у мікропрепаратах з 14–24-годинних культур на МПА.

Вид фіксації (над полум'ям спиртівки чи пальника, обробка хімічними речовинами як от метанол, етанол, рідина Никифорова) не виявили суттєвої різниці у якості специфічного світіння мікробних клітин у мікропрепаратах із культур. У той же час, у мікропрепаратах із паренхіматозних органів за експериментального колібактеріозу ми отримали значно кращі результати за умови їх фіксації метанолом або рідиною Никифорова. Очевидно, фіксація на полум'ї призводить до утворення якоїсь органічної плівки, що перешкоджає проникненню мічених глобулінів до антигенів кишкової палички, які розташовані в глибших шарах тканин мазка-відбитка, тоді як органічні розчинники, навпаки, відкривають доступ до них, розчиняючи жироподібні речовини, що утворюють цю захисну плівку.

Вивчення тривалості (експозиції) обробки мікропрепаратів міченими ешерихіозними глобулінами на якість МФА показало, що 20-хвилинний

контакт останніх із специфічними антигенами мікробних клітин у вологій камері за 37 °С є достатнім для забезпечення специфічного світіння на 4 плюси.

Вивчаючи вплив способу відмивання мікропрепаратів на результати РІФ, нами встановлено, що у мікропрепаратах, відмитих дистильованою водою, світіння клітин *E. coli* виявилось менш яскравим порівняно з мікропрепаратами, які були відмиті 0,85 % розчином натрію хлориду з рН 7,6 або навіть проточною водопровідною водою.

Для найкращих результатів реакції імунофлуоресценції для мічених ешерихіозних глобулінів, слід дотримуватись наступних умов:

- для виготовлення мікропрепаратів використовувати 10–20-годинні культури на МПБ або 14–24-годинні культури на МПА;
- фіксувати мікропрепарати культур можна на полум'ї спиртівки чи газового пальника, а мікропрепарати, виготовлені як мазки-відбитки із паренхіматозних органів, – метанолом впродовж 10 хв за кімнатної температури або етанолом протягом 20 хв за 37 °С;
- час обробки препаратів міченими ешерихіозними глобулінами в умовах вології камери – не менш як 20 хв;
- для відмивання використовувати 0,85 % розчин натрію хлориду з рН 7,6 або водопровідну воду протягом 10 хв.

Встановивши оптимальні умови використання мічених ешерихіозних глобулінів, ми приступили до вивчення їх діагностичних можливостей з допомогою МФА з метою індикації та ідентифікації ентерпатогенних кишкової палички в чистих і змішаних культурах, патологічному матеріалі та інших біотичних та абіотичних об'єктах.

3.4.7. Визначення чутливості та діагностичної цінності МФА з метою індикації та ідентифікації ентеропатогенних β -гемолітичних ізолятів *E. coli* з допомогою мічених ешерихіозних глобулінів

Чутливість та діагностичну цінність прямого варіанту МФА як експрес-методу індикації та ідентифікації *E. coli* визначили одночасно із іншими мікробіологічними методами дослідження, зокрема мікроскопічним, культуральним і біохімічною ідентифікацією культур в необхідних випадках.

Матеріалом для досліджень слугували культури гомологічного та гетерологічних штамів *E. coli*, тест-штамів та польових ізолятів *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, а також *Pseudomonas aeruginosa*, патологічний матеріал від трупів білих мишей за експериментального колібактеріозу.

Це дослідження проводили у три етапи. На першому етапі було зроблено порівняльну оцінку чутливості мікроскопічного, імунофлуоресцентного та культурального методів для індикації *E. coli* в чистих культурах. Для цього із 14–16-годинних культур тест-штаму *E. coli* готували суспензії мікробних клітин із зменшувальною концентрацією – від 100 млн до 10 мікробних клітин в 1 см³. Із кожної суспензії готували по 2 мазки окремо для світлової мікроскопії (фарбування за Грамом) і для імунофлуоресцентної. Одночасно робили посіви на середовище Ендо, які інкубували за 37 °С протягом 20±2 год. Результати дослідження наведені у табл. 3.12.

Таблиця 3.12

Чутливість мікроскопічного, імунофлуоресцентного та культурального методів з метою виявлення *E. coli* в суспензіях чистих культур за різних концентрацій (м.к./1 см³) (n=10)

Метод дослідження	Результати досліджень суспензій <i>E. coli</i> із концентрацією, м.к./см ³					
	10	100	1 тис.	10 тис.	100 тис.	1 млн.
Мікроскопічний (фарбування за Грамом)	0	0	0	10	10	10
Імунофлуоресцентний (прямий варіант МФА)	0	6*	10	10	10	10
Культуральний (висів на Ендо)	4**	10	10	10	10	10

Примітка: * – виявляли *E. coli* (одна мікробна клітина на 6–10 полів зору);

** – виявляли ріст колоній *E. coli*.

Дані таблиці 3.12 свідчать, що імунофлуоресцентний метод є чутливішим, ніж мікроскопічний, бо дає можливість виявляти *E. coli* в суспензіях із концентрацією 100 клітин в 1 см³, тоді як поріг чутливості мікроскопічного методу становив 10 тис. клітин в 1 см³ досліджуваних суспензій.

Проте імунофлуоресцентний метод є менш чутливим порівняно із культуральним, який дозволяє виявляти *E. coli* у чистих суспензіях, що містять 10 мікробних клітин в 1 см³.

Відомо, що у біологічних матеріалах, окрім *E. coli*, можуть перебувати інші бактерії. Тому культури, отримані при посівах такого матеріалу, можуть бути змішаними, а кількість мікробних клітин *E. coli* може бути значно меншою порівняно з представниками інших видів бактерій родини *Enterobacteriaceae*.

Зважаючи на це, нами проведено наступний етап дослідження, який був спрямований на вивчення діагностичних можливостей імунофлуоресцентного та культурального методів виявлення *E. coli* в змішаних суспензіях таких видів

бактерій як *S. enteritidis*, *C. freundii*, *P. vulgaris* і *P. aeruginosa* *E. coli* у різних співвідношеннях.

Для цього були приготовані вихідні суспензії 18–20-годинних агарових культур *S. enteritidis*, *C. freundii*, *P. vulgaris* і *P. aeruginosa* у концентрації 500 тис. мікробних клітин в 1 см³. До цих суспензій додавали по 1 см³ суспензії 18-годинної агарової культури *E. coli* із спадаючими на один порядок (:10) концентраціями, починаючи із концентрації 500 тис./см³. Таким чином, кожна змішана суспензія у пробірці містила по 250 тис./см³ мікробних клітин гетерологічного виду бактерій і від 250 тис. до 0,025 тис./см³ мікробних клітин *E. coli*. З кожної суспензії на МПА і на середовище Ендо (по одній чашці) висівали поверхневим способом по 0,25 мл та готували по 2 мазки для досліджень у прямому варіанті МФА. Результати дослідів подані в таблиці 3.13.

Таблиця 3.13

Чутливість імунофлуоресцентного і бактеріологічного методів за умови індикації *E. coli* в суспензіях змішаних культур

Вміст <i>E. coli</i> (тис.м.т. в 1 см ³)	Види ентеробактерій у суспензії із <i>E. coli</i>							
	<i>S. enteritidis</i>		<i>C. freundii</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. vulgaris</i>	
	МФА	Бактер. метод	МФА	Бактер. метод	МФА	Бактер. метод.	МФА	Бактер. метод
250	128±12	+	115±15	+	96±9	+	131±16	+
25	48±7	–	31±4	–	36±5	–	41±6	–
2,5	25±3	–	11±2	–	14±3	–	24±4	–
0,25	11±1	–	9±3	–	4±1	–	13±3	–

Примітка: – цифри в графі «МФА» означають кількість клітин в 1 полі зору (для концентрацій 250, 25, 2,5 тис./ см³) і в трьох полях зору (для концентрацій 0,25 тис/см³).
+ – бактеріологічно виділено культури *E. coli*.

Контролем бактеріологічного методу були посіви на МПА, зроблені із суспензій чистих культур кожного з досліджуваних видів бактерій.

Контролями імунофлуоресцентного методу були мікропрепарати, виготовлені із суспензій клітин *E. coli* та інших досліджуваних видів бактерій, оброблені міченими ешерихіозними глобулінами у робочому розведенні.

Дані таблиці 3.13 демонструють, що із 250-тисячних сумішей мікробних клітин будь-якої з досліджуваних бактерій культуру *E. coli* бактеріологічно можна виділити лише за умови вмісту в них не менш як 250 тис. м.к./см³ (співвідношення *E. coli* до іншого виду бактерій 1:2), тоді як специфічне світіння мікробних клітин *E. coli* можна виявити навіть у мікропрепаратах, що виготовлені із суспензій зі співвідношенням в них клітин *E. coli* до клітин гетерологічних видів 1:2000. Це є прямим доказом того, що діагностичні можливості МФА з використанням ешерихіозних глобулінів у випадках індикації та ідентифікації *E. coli* в змішаних суспензіях, а отже, і в змішаних культурах, значно (у нашому випадку у 2 тисячі разів) вищі, ніж такі бактеріологічного методу.

Відомо, що в умовах діагностичних лабораторій (клінічних, фітосанітарних, ветеринарних) матеріалом для досліджень на ешерихіоз у більшості випадків є різні види біологічних матеріалів, зокрема фекалії, сеча, секційний матеріал (шматочки паренхіматозних органів, кістковий мозок, вміст кишечника, мезентеріальні лімфатичні вузли), молоко від корів, фекалії, сеча, патологічний матеріал (шматочки паренхіматозних органів, кістковий мозок, вміст кишечника, мезентеріальні лімфатичні вузли), відібраний після загибелі тварини, а також овочі, фрукти, змиви з м'ясотуш та ін.

В силу різних причин, зокрема порушення вимог до відбору матеріалу на дослідження, внаслідок порушення умов та термінів зберігання відібраного матеріалу або при ускладненнях інфекційного процесу іншими бактеріальними інфекціями матеріал може бути контамінований вторинною мікрофлорою. Тому третім етапом нашого дослідження було вивчення можливостей імунофлуоресцентного методу за умов індикації та ідентифікації *E. coli* безпосередньо у патологічному матеріалі, отриманому за експериментального колібактеріозу білих мишей, ускладненого асоціаціями деяких видів бактерій.

З цією метою ми використали ентеропатогенний β -гемолітичний штам *E. coli* та по одному штаму *P. aeruginosa* і *S. enteritidis*. Білих мишей заражали 24-годинними культурами вказаних мікроорганізмів (однакові об'єми культур з концентраціями 1 млн. м.т./см³ культур *E. coli* і *P. aeruginosa*, *E. coli* і *S. enteritidis*, які перед інфікуванням змішували і вводили білим мишам внутрішньоочеревинно в дозі 0,5 см³. Після загибелі тварин з серця, легень, печінки, селезінки та нирок робили мікропрепарати-відбитки (один для фарбування за Грамом, інший – для обробки міченими ешерихіозними глобулінами) і висівали на МПБ і МПА (в пробірках) та середовище Ендо (зонально в чашках). Ідентифікували виділені культури за тинкторіально-морфологічними і культурально-біохімічними властивостями. Результати дослідів у таблиці 3.14.

Таблиця 3.14

Чутливість бактеріологічного методу та МФА за умови ідентифікації *E. coli* в патологічному матеріалі за експериментального колібактеріозу білих мишей, ускладненого асоціаціями *P. aeruginosa* та *S. enteritidis*

Досліджуваний матеріал	Бактеріологічний метод			МФА		
	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> + <i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> + <i>S. enteritidis</i>
Печінка	3*	3	3	3	3	3
Селезінка	3	1	2	3	3	3
Нирки	3	2	2	3	3	3
Серце	3	3	2	3	3	3
Легені	3	1	1	3	3	3

Примітка: * – кількість позитивних результатів, у яких ідентифіковано *E. coli* (n=3).

Результати наведені в таблиці 3.14 показують, що за умов виявлення, виділення та диференціації *E. coli* у паренхіматозних органах трупів білих мишей, які загинули від експериментального колібактеріозу, викликаного чистими культурами ентеропатогенного β -гемолітичного штаму *E. coli* та суспензіями культур патогенних штамів *P. aeruginosa* і *S. enteritidis*,

імунофлуоресцентний метод за своїми індикаційними та ідентифікаційними властивостями не поступається бактеріологічному методу. Навпаки, як показують результати нашого дослідження, у низці випадків (у випадках змішаної інфекції, спричиненої близькими за морфологією та культурально-біохімічними властивостями) він виявився більш чутливим, ніж бактеріологічний метод.

На рисунку 3.13 показане специфічне світіння на 4 плюси клітин *E. coli* в мазку-відбитку з печінки білої миші, що загинула за експериментального ешерихіозу.

Це особливо важливо у випадках, коли маємо справу із ешерихіозами, що ускладнені іншими патогенними видами бактерій, подібними до *E. coli* за морфологічними ознаками та культурально-біохімічними властивостями.

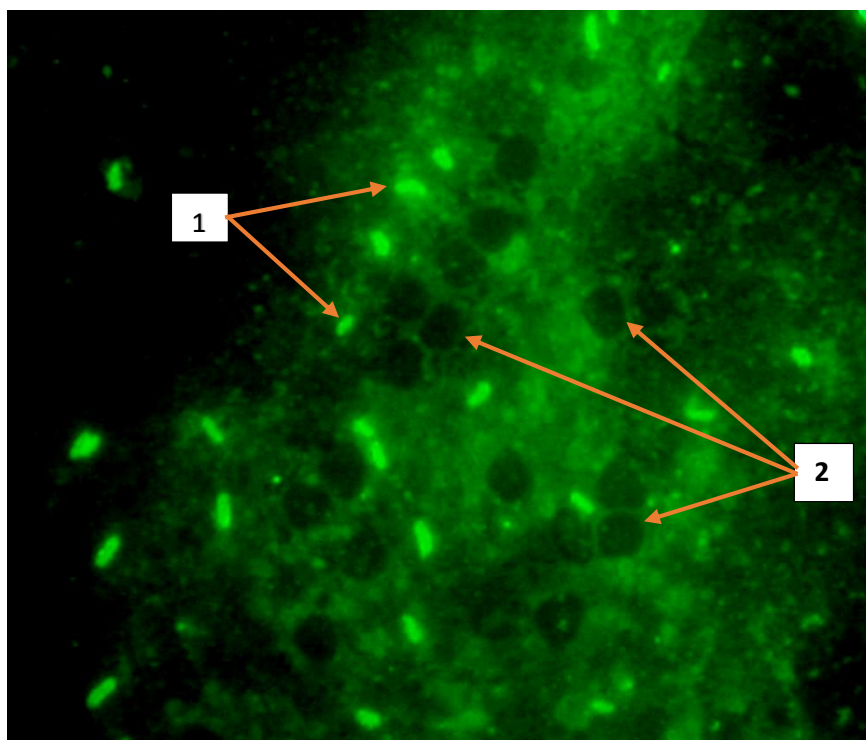


Рис. 3.13. *E. coli* в мазку-відбитку з печінки трупа білої миші за експериментального ешерихіозу (обробка міченими ешерихіозними глобулінами в робочому розведенні; $\times 1000$; 1 – клітини *E. coli*, світіння на 3–4+; 2 – клітини паренхіми печінки).

Зважаючи на те, більшість нозологічних форм ешерихіозів тварин і людини протікають у прихованій формі, а сам збудник знаходиться у звичних біотопах людського чи тваринного організму як коменсал, а не як вірулентний патоген, тому виявлення ентеропатогенних штамів і особливо тих, що володіють β -гемолітичністю, має важливе мікробіологічне, епізоотологічне та епідеміологічне значення. Сигнальне повідомлення про циркуляцію у популяції того чи іншого виду тварин і, в тому числі, людей потенційно патогенної кишкової палички, тим паче такої, що має гемолітичні властивості, є підставою для вживання термінових превентивних заходів, спрямованих на розширення та поглиблення діагностичних дій, а також протиепідемічних, протиепізоотичних та лікувально-профілактичних заходів.

Тому наступним етапом було вивчення діагностичних можливостей МФА з метою виявлення та ідентифікації патогенних за β -гемолітичністю *E. coli* у біологічних матеріалах від здорових тварин і продуктів тваринного походження таких як молоко, м'ясо із м'ясотуш, а також із абіотичних об'єктів таких як фекалії і сеча.

Для цього зразки молока і фекалій по 10 г висівали у 90 мл ЗПВ (забуференої пептонної води) – співвідношення 1 до 10. Підрощували у термостаті за температури 42 °C протягом 12 год. Із підрощених культур проводили висіви на середовище Ендо і МПА (в чашках) з наступною інкубацією посівів за 42°C протягом доби та ідентифікацією виділених культур *E. coli* за біохімічними показниками і встановленням β -гемолітичності на кров'яному МПА.

Відбирали зразки яловичини, свинини по 25 г та сечі по 25 мл, вносили у стерильні мішки з бактерійними фільтрами, додавали по 225 мл ЗПВ, гомогенізували з допомогою Bag Міхер протягом 60 с. Відбирали по 100 мл фільтрату з кожного зразка і підрощували за температури 42 °C протягом 12 год. Після цього підрощені культури висівали на СЕ і МПА (в чашках) з наступною інкубацією посівів за 42 °C протягом доби та ідентифікацією

виділених культур *E. coli* за біохімічними показниками і встановленням β -гемолітичності на кров'яному МПА.

Паралельно готували 2 мікропрепарати – по одному для імунофлуоресцентної (обробка міченими ешерихіозними глобулінами у робочому розведенні) та світлової (фарбування за Грамом) мікроскопії.

Результати цього досліджу, як показують дані таблиці 3.15, свідчать про те, що імунофлуоресцентний метод за чутливістю не поступається бактеріологічному методу, а за швидкістю виконання та об'єктивною демонстративністю, а отже, в цілому, за ефективністю значно перевищує бактеріологічний метод за умови індикації та ідентифікації ентеропатогенних β -гемолітичних *E. coli* в біологічних об'єктах від клінічно здорових сільськогосподарських тварин.

Таблиця 3.15

Чутливість бактеріологічного та імунофлуоресцентного методів за умови ідентифікації ентеропатогенної β -гемолітичної *E. coli* в біологічних матеріалах, відібраних від клінічно здорових тварин (n=10)

Метод дослідження	Результати порівняльного дослідження біологічних матеріалів :					
	Молоко*	Сеча**	Фекалії від		М'ясо	
			Телят***	Поросят****	Яловичина	Свинина
Бактеріологічний	8/4	10/3	10/2	10/5	7/2	5/2
Імунофлуоресцентний	6	6	4	8	4	3

Примітка: * – молоко від клінічно здорових корів із негативною димастиновою пробою на мастит; ** – від клінічно здорових корів; *** – від новонароджених телят до 10-денного віку; **** – від поросят 2-місячного віку до відлучки; значення у чисельнику – це кількість ідентифікованих ізолятів *E. coli*, у знаменнику – кількість β -гемолітичних ізолятів *E. coli*, що підтверджено культурально.

З даних, наведених у таблиці 3.15 видно, що за допомогою бактеріологічного методу із десяти зразків молока виділено 8 ізолятів *E. coli*, із яких 4 проявили β -гемолітичні властивості. В той же час, імунофлуоресцентно в шести зразках молока ідентифіковано як β -гемолітичні 6 ізолятів, тобто на 2 більше, ніж за допомогою бактеріологічного методу. Цей факт може вказувати на те, що мічені ешерихіозні глобуліни виявили у шести із восьми ізолятів кишкової палички поверхневі антигенні структури, які асоціюються із β -гемолітичністю. Проте, лише 4 з них проявили β -гемолітичність культурально. Виявлена розбіжність може свідчити про те, що експресія антигенних детермінант β -гемолітичності на поверхні мікробних клітин *E. coli* не завжди реалізується в рутинних умовах бактеріологічного культивування. Тому відсутність β -гемолітичності за показником культуральної ідентифікації, як бачимо, не являється аргументом, що ізолят *E. coli* не є ентеропатогенним. І, навпаки, виявлення β -гемолітичності за допомогою МФА є підставою для здійснення діагностичних заходів, спрямованих на підтвердження або спростування ентеропатогенності ізолятів *E. coli*, особливо, коли вони ідентифікуються в зразках із потенційних джерел збудників ешерихіозу або харчових токсикоінфекцій ешерихіозної природи.

З наведених у таблиці 3.15 даних видно, що подібні результати отримано і при дослідженні сечі – із 10 зразків сечі бактеріологічно ізолювано та ідентифіковано 10 культур *E. coli*, три з яких були β -гемолітичними, тоді як імунофлуоресцентно ідентифіковано 6 ентеропатогенних за показником β -гемолітичності культур кишкової палички.

Подібну закономірність спостерігали, досліджуючи зразки фекалій від новонароджених телят, 2-місячних поросят перед відлучкою, а також зразки яловичини та свинини (табл. 3.15). Зразки фекалій відбирали від клінічно здорових новонароджених телят і 2-місячних поросят перед відлучкою. Виявлення ентеропатогенних за показником β -гемолітичності кишкових паличок свідчить про те, що в організмі новонароджених телят і поросят перед

відлучкою у харчотравному тракті переживають ентеропатогенні кишкові палички, які за впливу на сприйнятливий організм тих чи інших сприяючих або схиляючих факторів, здатні спричинити виникнення інфекційного процесу. Виявлення ентеропатогенних ізолятів кишкової палички у м'ясотушах, отриманих від забитих здорових тварин (велика рогата худоба, свині) дає підставу припустити, що ентеропатогенні патотипи кишкової палички, циркулюють в організмі як молодих, так і дорослих продуктивних тварин, що значно розширює ареал потенційних джерел збудників ешерихіозу.

Отримані результати в цьому досліді, як і в попередніх, вказують на те, що імунофлуоресцентний метод за чутливістю не поступається бактеріологічному, а за швидкістю виконання та об'єктивною демонстративністю, а отже, в цілому, за ефективністю значно перевищує бактеріологічний метод, що дає підставу віднести МФА до експрес-методів індикації та ідентифікації ентеропатогенних β -гемолітичних *E. coli* в біологічних об'єктах від клінічно здорових сільськогосподарських тварин.

Відпрацювання всіх технологічних аспектів виготовлення специфічних мічених ешерихіозних глобулінів, методичних прийомів їх використання за умови дослідження різних біологічних, зрештою й абіотичних (вода, ґрунт, овочі, фрукти, змиви із поверхні приміщень тощо), матеріалів дає в руки спеціалістів діагностичних лабораторій, які працюють в системі контролю «Єдине здоров'я» і відслідковують ймовірні джерела та шляхи потрапляння ентеропатогенних β -гемолітичних кишкових паличок в продукти харчування на різних ділянках ланцюга «Від поля до столу», високоефективний лабораторний інструмент, який за своєю діагностичною цінністю не поступатиметься імунофлуоресцентному методу діагностики сказу.

За отриманими результатами проведених досліджень нами підготовлено методичні рекомендації з виготовлення та застосування імунофлуоресцентних ешерихіозних глобулінів з метою їх широкого апробування в умовах діагностичних лабораторій Держпродспоживслужби та мікробіологічних

лабораторій клінічних лікарень, у науково-навчальних лабораторіях ЗВО, а також у науково-дослідних лабораторіях.

Широка апробація прямого варіанту МФА та його верифікація в умовах діагностичних лабораторій з метою експрес індикації та ідентифікації ентеропатогенних β -гемолітичних *E. coli* допоможе відшліфувати шерехатості запропонованого методу і цим довести його застосування до такого професійного рівня, що реакцію імуофлуоресценції у прямому варіанті можна буде вписувати як експрес-метод у Державний стандарт контролю продуктів харчування на наявність ентеропатогенної кишкової палички.

3.5. Економічний ефект від застосування МФА як експрес-методу індикації та ідентифікації ентеропатогенних кишкових паличок в об'єктах довкілля та біоматеріалах від хворих з підозрою на ешерихіози

Індикація та ідентифікація ентеропатогенної *E. coli* з допомогою мікробіологічних методів є досить витратною і тривалою у виконанні і, що найважливіше, не завжди ефективною. МФА у цьому плані має низку істотних переваг, зокрема вищу чутливість, точність, нескладність виконання, а отже в цілому є економічно вигіднішим.

Визначення економії матеріально-грошових витрат на проведення одного мікробіологічного дослідження на ешерихіоз проводили за формулою (3.1):

$$E_z = Z_{\text{бак}} - Z_{\text{мфа}}, \quad (3.1)$$

де E_z – економія витрат на проведення одного дослідження після застосування МФА;

$Z_{\text{бак}}$ – витрати на проведення одного дослідження бактеріологічним методом;

$Z_{\text{мфа}}$ – витрати на проведення одного дослідження з допомогою МФА.

Згідно зі схемою лабораторного дослідження біологічного матеріалу на ешерихіоз з допомогою загальноприйнятих бактеріологічних методів матеріально-грошові витрати на проведення одного дослідження включають вартість використаних поживних середовищ, дезінфікуючих засобів, електроенергії, піддослідних тварин (табл. 3.16), а також витрати на оплату праці робочого часу лікаря-бактеріолога, лаборанта, техперсоналу.

Таблиця 3.16

**Вартість матеріалів на проведення одного дослідження на ешерихіоз
бактеріологічним методом**

Матеріали і засоби	Одиниця вимірювання	Кількість	Вартість, в грн.	Загальна вартість, грн.
1	2	3	4	5
МПБ	кг	0,05	900,00	45,00
МПА	кг	0,05	1320,00	66,00
Агар Ендо	кг	0,04	1940,00	77,60
Середовище Левіна	кг	0,04	1752,00	70,10
Середовище Олькеницького	кг	0,04	2100,00	84,00
Кров'яний ГМПА	кг	0,04	3200,00	24,30
МПЖ	кг	0,05	218,50	10,92
Агар Сімонса	кг	0,05	2400,00	128,00
МПА з сечовиною	кг	0,04	2580,00	103,20
Середовища Гісса з глюкозою	кг	0,02	1680,00	33,60
Середовища Гісса з лактозою	кг	0,02	690,00	13,80
Середовища Гісса з сахарозою	кг	0,02	1590,00	31,80
Середовища Гісса з мальтозою	кг	0,02	1500,00	30,00
Середовища Гісса з манітом	кг	0,02	1485,00	9,70
Хлороформ	л	0,01	300,00	3,00
Білі миші (біопроба)	особин	3	50,00	150,00
Дезінфекційний розчин	кг	0,01	110,00	1,10
Етанол	л	0,1	450,00	45,0
Вата	кг	0,2	200,00	40,00
Всього, грн.				967,12

Як видно з таблиці 3.16, загальна вартість матеріалів на проведення одного бактеріологічного дослідження на ешерихіоз становлять 967,12 грн (станом на жовтень 2025 року).

Використання МФА для індикації та ідентифікації *E. coli* у біологічному (патологічному) матеріалі за умови позитивного результату дозволить видати

заключення вже протягом перших 2–3 год, що відповідно відобразиться на витратах матеріалів (табл. 3.17).

Таблиця 3.17

Матеріальні витрати на проведення одного дослідження з метою ідентифікації ентеропатогенної *E. coli* методом флуоресціюючих антитіл у випадку отримання позитивного результату

Матеріали та засоби	Одиниця вимірювання	Кількість	Ціна, в грн.	Загальна вартість, в грн.
Мічені ешерихіозні глобуліни	мл	0,01	2500,00	25,00
Етиловий спирт	л	0,02	450,00	9,00
Дезрозчин	кг	0,01	110	1,10
Всього, грн.				35,10

У випадку негативного результату імуофлуоресцентного дослідження за первинного дослідження біологічного матеріалу, необхідно додатково висіяти досліджуваній матеріал на елективні живильні середовища (ЗПВ, МПБ, Ендо), а тоді вже провести та імуофлуоресцентне дослідження виділених культур. У цьому випадку до витрат на проведення імуофлуоресцентного дослідження вихідного матеріалу (35,10 грн.) додадуться витрати на проведення посівів та імуофлуоресцентні дослідження виділених культур (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

Матеріальні витрати на висів досліджуваного матеріалу на живильні середовища та ідентифікацію виділених культур з допомогою МФА

Матеріали та засоби	Одиниця вимірювання	Кількість	Ціна, у грн.	Загальна вартість, в грн.
Пептонна вода	кг	0,05	900,00	45,00
МПБ	кг	0,025	900,00	22,50
Середовище Ендо	кг	0,02	1940,00	38,80
Мічені ешерихіозні глобуліни	мл	0,01	2500,00	25,00

Продовження таблиці 3.18

Етиловий спирт	л	0,05	450,00	22,50
Дезінфекційний розчин	л	0,01	110	1,10
Всього, грн.				154,90

Як видно з табл. 3.17, матеріальні витрати на проведення одного дослідження біологічного матеріалу із попереднім виділенням культури кишкової палички на елективних живильних середовищах із наступною імунофлуоресцентною ідентифікацією виділених культур склали 154,9 грн.

В таблиці 3.19 наведені витрати на оплату праці працівників мікробіологічної лабораторії за умови проведення одного дослідження з метою виявлення, виділення та ідентифікації ентеропатогенної *E. coli* у біологічному матеріалі мікробіологічним методом та методом флуоресціюючих антитіл.

Таблиця 3.19

**Витрати на оплату праці за умови проведення одного дослідження на
ешерихіоз мікробіологічним методом та методом флуоресціюючих
антитіл**

Назва посади	Мікробіологічний метод		Імунофлуоресцентне дослідження:			
			Вихідного матеріалу		Виділених культур	
	год.	грн	год.	грн	год.	грн
Бактеріолог	2,5	468,75	0,5	93,75	1	187,50
Лаборант	3,8	570,00	1	150,00	2	300,00
Техпрацівник	3,0	337,5	0,5	56,25	1,5	84,38
Разом	9,3	1376,25	2	300,00	4,5	571,88

Як видно з таблиці 3.19, витрати на оплату праці працівників за умови проведення одного дослідження мікробіологічним методом становило 1376,25 грн, тоді як методом флуоресціюючих антитіл вихідного матеріалу – 300 грн або, якщо дослідження продовжиться до виділення культури та її імунофлуоресцентного дослідження, – 571,88 грн.

Сумарно витрати на проведення одного дослідження на ешерихіоз бактеріологічним методом ($Z_{\text{бак}}$) буде становити 2343,37 грн.

(967,12 + 1376,25), методом флуоресціюючих антитіл ($З_{\text{мфа1}}$) – 335,10 грн (35,10 + 300,00) або 726,78 грн (154,90 + 571,88) у випадку необхідності виділення культури та імунофлуоресцентного дослідження останньої ($З_{\text{мфа2}}$).

Виходячи з цих показників, економія витрат на проведення одного дослідження на ешерихіоз з допомогою методу флуоресціюючих антитіл в першому випадку становитиме:

$$E_3 = Z_{\text{бак}} - Z_{\text{мфа1}} = 2343,37 - 335,10 = 2008,27 \text{ грн.}, \text{ а в другому –}$$

$$E_3 = Z_{\text{бак}} - Z_{\text{мфа2}} = 2343,37 - 726,78 = 1616,59 \text{ грн.}$$

Отже, економічний ефект від впровадження імунофлуоресцентного методу в практику лабораторно-діагностичних досліджень біологічних матеріалів з метою виявлення та ідентифікації ентеропатогенних кишкових паличок – потенційних будників ешерихіозів людини становитиме від 2008,27 грн. до 1616,59 грн. на одне дослідження (станом на жовтень 2025 року).

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Аналіз наукової літератури та результати власних досліджень свідчать про багатогранну та неоднозначну оцінку ролі *E. coli* як патогена та еволюцію її патогенності, екологію і убіквітарність кишкової палички, про нерівномірний як в просторі, так і у часі прояв різних форм ешерихіозів у світі, на територіях окремих країн та адміністративних районів [44, 55, 110, 146, 150].

E. coli – кишковий коменсал, який володіє цілим арсеналом факторів патогенності, а тому під час впливу сприятливих чи зумовлюючих факторів на сприйнятливий організм, може спричиняти кишкові (ураження шлунку та кишок) або позакишкові (бактеріємію, абдомінальну інфекцію чи запалення органів малого таза, інфекції сечових шляхів (ІСШ), інфікування ділянок хірургічного втручання, абсцеси головного мозку та ранові інфекції) інфекції в людей [9, 10, 109].

Захворювання, етіологічним чинником яких є ентеропатогенні кишкові палички, мають назву ешерихіози [110].

Серед усіх інших відомих бактерій будова, фізіологія та екологія *E. coli* вивчена найповніше. Проте, залишаються недостатньо вивченими її патогенетичні властивості та пов'язані з цим такі біологічні явища як інфекційний та епідемічний (епізоотичний) процеси [110]. Дослідження основних рушійних сил епідемічного процесу ешерихіозів дасть змогу встановити їх пріоритетність і на цій основі вибудовувати стратегію ефективного контролю та профілактики цієї інфекції. Адже лікування ешерихіозів на зазначеному етапі вимагає значних матеріальних ресурсів у сфері охорони здоров'я [109].

Успішність боротьби з ешерихіозами людини залежить від багатьох чинників, зокрема, зоологічних. Так, циркуляція ЕРЕС у популяціях

продуктивних сільськогосподарських, домашніх та диких тварин сприяє не лише виживанню, але й підтриманню вірулентних властивостей *E. coli* на популяційному рівні і цим сприяє функціонуванню епізоотичного процесу тварин та епідемічного процесу ешерихіозів людини [68, 132].

Ешерихіози тварин не тільки завдають значних економічних збитків господарствам, які займаються виробництвом тваринницької продукції, але й не менш важливим фактом є те, що продуктивні тварини – потенційне джерело і природний резервуар ентеропатогенних кишкових паличок [110].

На основі цього з'ясовано, що контамінація агропромислової продукції ентеропатогенними кишковими паличками становить серйозну проблему продовольчій безпеці країни.

Продовольча безпека країни представляє такий рівень продовольчого забезпечення населення якісною та безпечною продукцією, який гарантує соціально-політичну стабільність у суспільстві, виживання та розвиток нації, особи, сім'ї, сталий економічний розвиток. Проблема продовольчої безпеки не має кон'юнктурного характеру. Вона буде існувати доти, поки є держава, визначальним фактором сили та авторитету якої є підтримання відповідного рівня продовольчої безпеки. Підтвердженням цього є правове забезпечення та постійна увага до проблем продовольчої безпеки у країнах ЄС, США, Японії та інших розвинутих регіонах світу [8].

У комплексі проблем забезпечення продовольчої безпеки України важливе місце займає моніторинг тваринницької продукції за показниками якості та безпечності. Моніторинг якості та безпечності сільськогосподарської продукції є складовою стратегії «Єдине здоров'я». Основними завданнями цієї стратегії у межах повноважень ветеринарної медицини є збір, аналіз і систематизація інформації щодо забрудненості кормів і продукції тваринництва залишками агрохімікатів, ветеринарними препаратами, різноманітними токсичними речовинами та біотичними контамінантами [2, 8].

До останніх відносять низку токсиковарів ентеропатогенних штамів кишкової палички [110]. Зважаючи на це, розроблення експрес-методів виявлення та ідентифікації різноманітних патогенних біоконтамінантів відноситься до основних завдань науково-методичного забезпечення моніторингу безпечності продукції тваринного походження, а отже є актуальною темою наукових пошуків [133].

За даними ВООЗ, дитяча діарейна інфекція, спричинена ентеропатогенними штамами кишкової палички, у країнах, що розвиваються, є серйозним і постійно зростаючим ризиком для здоров'я, бо важко піддається лікуванню через появу штамів резистентних до загальноновживаних антибіотиків [67, 128]. Особливо небезпечною в цьому плані є шигатоксин-продукуюча *E. coli* O157:H7, яка, крім цього, спричиняє низку кишкових і позакишкових захворювань у людини [80, 132].

Ентерогеморагічна кишкова паличка O157:H7 – це зоонозний патоген, який відповідає за відносно невелику кількість спалахів харчових отруєнь та захворювань порівняно з іншими харчовими бактеріями, здатними викликати інфекції у населення. Проте, *E. coli* O157:H7 – це бактеріальний патоген, пов'язаний із важкими захворюваннями людини, включаючи криваву діарею та гемолітико-уремічний синдром, що виникають як у епідемічні спалахи, так і спорадії. Поширеність *E. coli* O157:H7 має сезонну залежність, з більшим виділенням мікроорганізму з фекаліями в теплі місяці [132].

А. Rani et al. [133] вважають, що *E. coli* O157:H7, яка продукує Шигатоксин, є основним патогенним штамом кишкової палички, який із початку 1980-х років став ключовим патогеном, що передається через харчові продукти та воду. Для контролю поширення інфекції можна застосувати кілька стратегій управління епідемічним процесом. Однак, рання діагностика є оптимальною профілактичною стратегією для мінімізації інфекції. Зважаючи на це, вкрай важливо швидко та ефективно виявляти цей патоген, щоб знизити захворюваність та смертність.

D. A. Zelellw *et al.* [26], вивчаючи етіологію неонатального сепсису в країнах світу, що розвиваються, встановили, що на *E. coli* припадає 15,30 % випадків серед інших збудників цієї патології, зокрема *Klebsiella spp.*, *S. aureus* та коагулазонегативний стафілокок. Ентероагрегативна *E. coli* (ЕАЕС), яка викликає гостру або стійку водянисту діарею (зі слизом або без нього) у дітей, ідентифікується переважно в країнах з низьким рівнем доходу і, зазвичай, пов'язана з діареєю мандрівників у дітей і дорослих у країнах із середнім і високим доходом [91, 145].

Множинна стійкість ЕАЕС до лікарських засобів має значне географічне поширення і пов'язана з неконтрольованим використанням антибіотиків, а також із туризмом, який сприяє глобальному поширенню опірності до антибіотиків [97, 146].

Рушійними силами епідемічного процесу за будь-якої інфекційної хвороби є джерело збудника інфекції, механізм його передання та сприйнятливий організм, взаємодія яких завжди відбувається на тлі впливу різноманітних чинників (природних, соціальних) [1, 12, 41].

Зважаючи на цей постулат, аналіз випадків ешерихіозної інфекції в цьому дослідженні ми проводили з екологічного та епідеміологічного кутів зору. Екологічна складова авторського погляду на епідеміологію ешерихіозів полягала в тому, що кишкові палички абіотичних та біотичних об'єктів зовнішнього середовища розглядалася нами як потенційний збудник ешерихіозів людини. Епідеміологічна складова полягала в тому, що виживання популяції кишкової палички як патогена в популяції людини продовжується, тобто еволюція патогенності кишкової палички триває, і завдяки міграційним процесам, які з кожним роком стають усе інтенсивніші, це відбувається значно швидше. Кишкова паличка із сапрофітного та ентобіотичного способів існування все частіше переходить на бік завершеного патогена (паразитична форма існування), про що свідчить велике розмаїття

клінічних форм її хвороботворного впливу на організм, а також множинність антигенних варіантів, що їх спричиняють.

Еволюції паразитизму *E. coli* сприяють такі чинники як збільшення контактів між носіями збудника і сприйнятливими організмами. Це відбувається на тлі зростання туризму, трудової міграції та військових конфліктів, а також за рахунок зростання популяції населення земної кулі [96, 97].

З іншого боку, неконтрольоване використання антибіотиків призводить до вдосконалення механізмів резистентності та агресії кишкової палички, що в кінцевому наслідку призводить до появи нових клінічних форм цієї інфекції, до колонізації цим мікроорганізмом все нових ніш людського організму [44, 115, 128].

Наведені факти та матеріали наукових досліджень показали, наскільки різноманітними є джерела ентеропатогенних форм кишкової палички, якими інколи непередбачуваними є шляхи, способи і чинники передавання цього патогена до сприйнятливих організмів та наскільки різноманітними є нозологічні форми, спричинені ентеропатогенними *E. coli*.

Повідомлення про виділення ентеропатогенних кишкових паличок від тварин, зокрема від великої рогатої худоби як потенційного джерела збудників ешерихіозів людини надходять з усіх континентів [28, 51, 65, 70, 89, 90, 125].

Дослідження, проведені в різних країнах (зокрема, Мексиці, Норвегії, США та Англії), однозначно підтвердили роль великої рогатої худоби як природного резервуара Шига-токсигенного штаму *E. coli* O157:H7 [47, 65, 70, 89].

Отже, ентеропатогенні кишкові палички як клінічно значущі та антибіотикорезистентні бактерії є поширеними в природі серед ссавців, диких птахів та рептилій, а тому їх не можна ігнорувати в епідеміологічному нагляді та контролі за інфекціями, спричиненими патогенними кишковими паличками, а предмети біотичного та абіотичного характеру довкілля,

насамперед харчового ланцюга, повинні бути об'єктами бактеріологічного моніторингу щодо наявності в них ентеропатогенних кишкових паличок [127, 162, 163].

Підсумовуючи результати епідеміологічного аналізу, можна відзначити, що :

- штами *E. coli*, які продукують вероцитотоксин, набули важливого медико-соціального значення як харчові патогени;
- існує понад 100 серотипів ЕНЕС; проте, O157:H7 є найвідомішим і найпоширенішим;
- резервуаром ентерогеморагічних кишкових паличок є велика рогата худоба, тому спалахи часто виникають внаслідок споживання недостатньо термічно обробленої яловичини (наприклад, гамбургерів);
- чинниками передачі ентерогеморагічних кишкових паличок можуть бути багато інших продуктів (свіжі овочі, сире молоко);
- шляхами передавання збудників ешерихіозів, крім аліментарного, може ще бути контактний (наприклад, прямий контакт із тваринами).

Зважаючи на все вище зазначене, бачимо, наскільки важливою є своєчасна й точна діагностика, спрямована на виявлення та ідентифікацію ентеропатогенних штамів *E. coli* в об'єктах довкілля, що можуть бути природними або тимчасовими резервуарами чи джерелами цих патогенів.

Моніторинг якості та безпечності аграрної продукції – важлива складова стратегії «Єдине здоров'я», основним завданням якої є збір, аналіз і систематизація інформації щодо забрудненості кормів і продукції тваринництва залишками агрохімікатів, лікувально-профілактичними препаратами, різноманітними токсичними речовинами та біотичними контамінантами. До останніх відносять низку токсиковарів ентеропатогенних штамів кишкової палички. Своєчасне виявлення та ідентифікація останніх в об'єктах довкілля має важливе епідеміологічне та епізоотологічне значення.

Тому розробка і впровадження для реалізації мети дослідження експрес-методів – актуальна і важлива наукова тематика.

Одним із перспективних методів експрес-індикації та ідентифікації ентеротоксигенних штамів *E. coli* в об'єктах довкілля та біоматеріалах з погляду ефективності (швидкості у виконанні, недороговартісності та специфічності) є метод флуоресціюючих антитіл. Цей метод поєднує в собі об'єктивність мікроскопічного методу та високу специфічність імунологічних реакцій [131]. Чутливість та специфічність імунофлуоресцентного методу залежить від багатьох факторів, зокрема, від антигенності вакцинних препаратів, схем імунізації та виду тварин-донорів [20].

Вивчення цитоморфологічних, біохімічних та імунологічних показників крові тварин-донорів у процесі їхньої імунізації двома вакцинними препаратами, виготовленими із ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli* показало, що вакцинний препарат, який був отриманий шляхом інактивації молодोї культури формальдегідом, мав значно вищий стимулюючий вплив як на гемопоез, так і на лімфопоез, що характеризувався підвищеним рівнем лейкоцитів, вищою фагоцитарною активністю та фагоцитарним індексом нейтрофілів, значно вищим рівнем аглютинінів та іншими показниками порівняно із стимулюючим впливом на організм тварин-донорів, спричинений вакцинним препаратом, виготовленим із мікробних клітин молодої культури, але інактивованої кип'ятінням. Очевидно, збережені поверхневі антигенні детермінанти (H-, K-, і O-антигени, екзотоксини) виявилися більш антигенно та імуногенно активнішими, ніж O-антиген, який був основним у другого вакцинного препарату. Наші висновки підтверджують спостереження, зроблені низкою інших дослідників [37, 149].

Для успішної індикації та ідентифікації ентеротоксигенних штамів кишкової палички за допомогою реакції імунофлуоресценції необхідно, щоб не лише вакцинні препарати володіли високою антигенною активністю, але й

щоб були старанно підібрані тварини-продуценти та схеми їхньої імунізації [20, 131].

У ході нашого дослідження було встановлено, що рівні антитіл у сироватці крові різних видів тварин за різних схем їх імунізації однотипним антигенним препаратом (5-мільярдна суспензія мікробних клітин 24-годинної культури ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli* на триптон-соевому дріжджовому бульйоні, інактивованих формальдегідом (0,4% до об'єму культури), концентрованих аеросилом А-300 (3 мг/мл) достовірно різняться між собою. Так, ця різниця у рівнях антитіл між другою і першою схемами імунізації в овець становить 35 %, у кролів – 22,8 %, у коней – 12,5 % і у ВРХ – 9,1 %. Очевидно, що четверте введення вакцинного препарату підсилило гуморальну відповідь у тварин, імунізованих за другою схемою, порівняно з першою, яка передбачала лише три ін'єкції вакцинного препарату. Можна стверджувати, що збільшення кількості ін'єкцій антигену позитивно впливає на зростання титрів аглютининів. Проте, майже у всіх, залучених до дослідів тварин, четверте введення препарату спричинило страх – тварини збуджено реагували на їхню фіксацію, тремтіли. У другій групі тварин на місці введення препарату утворилася розлита припухлість, спостерігалася місцеве підвищення температури і біль, який поступово зникав упродовж 6–8 діб. Ці ознаки є свідченням того, що у тварин вже після четвертого введення вакцинного препарату у різко зростальних дозах спостерігається сенсibilізація організму, яка спричиняє низку негативних реакцій із боку організму вакцинованих тварин. Тому для отримання активних ешерихіозних сироваток достатньо триразового введення препарату.

Аналіз наукових публікацій та звітів FAO (The Food and Agriculture Organization) [148] свідчить, що контроль за наявністю ЕРЕС і ЕТЕС в продуктах харчування – важлива складова стратегії «Єдине здоров'я». Розроблення експрес-методів індикації та ідентифікації цих видів патогенів є актуальною темою наукових пошуків. До таких можна віднести МФА.

Діагностична ефективність МФА залежить від активності та специфічності ешерихіозних діагностичних сироваток.

Наступним етапом нашого дослідження стало оцінювання специфічності бичачої імунної ешерихіозної сироватки, отриманої нами на ОН-антиген ентеропатогеного β -гемолітичного штаму *E. coli*. Встановлено, що отримана ешерихіозна сироватка була високоактивною і специфічною до ОН-антигенів гетерологічних штамів *E. coli*. Наявність антитіл до ОН-антигенів гетерологічних видів бактерій усунена шляхом адсорбування суспензією інактивованих клітин гетерологічного виду бактерій, до антигенів якого вона містила найвищий рівень аглютинінів.

Після отримання високоспецифічної ешерихіозної сироватки наступним етапом досліджень стало виготовлення мічених ешерихіозних глобулінів та визначення їхньої чутливості та діагностичної цінності у прямому варіанті МФА. Матеріалом для досліджень слугували культури гомологічного та гетерологічних штамів *E. coli*, тест-штамів та польових ізолятів *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* та *Pseudomonas aeruginosa*, патологічний матеріал від трупів білих мишей за експериментального колібактеріозу, молоко та сеча від корів, фекалії від новонароджених телят і поросят 2-місячного віку, зразки свіжого м'яса яловичини та свинини. Чутливість та діагностичну цінність прямого варіанту МФА з метою індикації та ідентифікації *E. coli* у вказаних матеріалах визначили одночасно з іншими мікробіологічними методами дослідження.

Було встановлено, що імуофлуоресцентний метод є чутливішим, ніж мікроскопічний, бо дає можливість виявляти *E. coli* в суспензіях із концентрацією 100 клітин в 1 см³ ($0,8 \pm 0,6^{**}$), тоді як поріг чутливості мікроскопічного методу становив 10 тис. клітин в 1 см³ ($1,7 \pm 0,8^{*}$) досліджуваних суспензій. Проте, імуофлуоресцентний метод виявився менш чутливим порівняно із культуральним, за допомогою якого можна виявляти *E. coli* у чистих суспензіях, що містили 10 мікробних клітин в 1 см³, – $4,4 \pm 0,6^{*}$.

Під час наступного етапу дослідження встановлено, що діагностичні можливості МФА у випадках індикації та ідентифікації *E. coli* в змішаних суспензіях *E. coli* із *S. enteritidis*, *E. coli* із *C. freundii*, *E. coli* із *P. vulgaris* і *E. coli* із *P. aeruginosa*, а отже, і в змішаних культурах набагато (у нашому випадку у 2 тисячі разів) вищі, ніж такі із застосуванням бактеріологічного методу.

Підсумки наших дослідів підтверджують результати, отримані низкою інших дослідників, які вивчали чутливість та діагностичну цінність МФА за діагностики бруцельозу, сибірки, туляремії та інших інфекційних захворювань [20].

Зважаючи на те, що в силу різних причин біологічний матеріал може бути контамінований вторинною мікрофлорою, тому третім етапом нашого дослідження стало вивчення діагностичних можливостей МФА з метою індикації та ідентифікації *E. coli* безпосередньо в патологічному матеріалі, отриманому за експериментального колібактеріозу білих мишей, ускладненого асоціаціями деяких видів бактерій. Як тест-штам використано ентеропатогенний β -гемолітичний штам *E. coli* та по одному штаму *P. aeruginosa* і *S. enteritidis*. Після загибелі тварин із серця, легень, печінки, селезінки та нирок готували мікропрепарати-відбитки (один для фарбування за Грамом, інший – для обробки міченими ешерихіозними глобулінами в робочому розведенні) і висівали на МПБ і МПА (в пробірках) та середовище Ендо (зонально в чашках). Ідентифікували виділені культури за тинкторіально-морфологічними і культурально-біохімічними властивостями. Встановлено, що імунофлуоресцентний метод за своїми індикаційними та ідентифікаційними властивостями не поступається бактеріологічному методу, а у випадках змішаної інфекції МФА виявляє вищу діагностичну спроможність, ніж бактеріологічний метод. Отримані результати узгоджуються із результатами низки інших науковців, які проводили порівняльні дослідження з іншими збудниками інфекційних захворювань [20].

Вивчення діагностичних можливостей МФА з метою виявлення та ідентифікації β -гемолітичних *E. coli* у біологічних матеріалах від здорових тварин (фекалії, сеча) і продуктах тваринного походження, таких як молоко і м'ясо із м'ясотуш, було ще одним етапом наших досліджень. У результаті проведеної роботи встановлено, що за допомогою бактеріологічного методу із 10 зразків молока виділено 8 ізолятів *E. coli*, із яких 4 були β -гемолітичними. В той же час імунофлуоресцентно ідентифіковано як β -гемолітичні 6 ізолятів, тобто на 2 більше, ніж за допомогою бактеріологічного методу. Цей факт може вказувати на те, що мічені ешерихіозні глобуліни виявили у шести із восьми ізолятів кишкової палички поверхневі антигенні структури, які асоціюються із β -гемолітичністю. Проте, лише 4 з них проявили β -гемолітичність культурально.

Виявлена розбіжність може свідчити про те, що експресія антигенних детермінант β -гемолітичності на поверхні мікробних клітин *E. coli* не завжди реалізується в рутинних умовах бактеріологічного культивування. Тому відсутність β -гемолітичності за показником культуральної ідентифікації не слугує аргументом, що ізолят *E. coli* не є ентеропатогенним за показником β -гемолітичності. І, навпаки, виявлення β -гемолітичності за допомогою МФА є підставою для здійснення діагностичних заходів, спрямованих на підтвердження або спростування ентеропатогенності ізолятів *E. coli*, особливо з потенційних джерел збудників ешерихіозу та харчових токсикоінфекцій ешерихіозної природи.

Звісно, що встановлений нами факт є підґрунтям для подальших порівняльних досліджень з метою його статистичної верифікації.

Аналогічні результати отримано при дослідженні сечі – із 10 зразків сечі бактеріологічно ізолювано та ідентифіковано 10 культур *E. coli*, три з яких були β -гемолітичними, тоді як імунофлуоресцентно ідентифіковано шість β -гемолітичних культур кишкової палички.

Подібну закономірність спостерігали, досліджуючи зразки фекалій від новонароджених телят і 2-місячних поросят перед відлучкою, зразки яловичини та свинини.

Отримані результати дають підставу стверджувати, що імунофлуоресцентний метод за чутливістю не поступається бактеріологічному, а за швидкістю виконання та об'єктивністю і в цілому, за ефективністю значно перевищує бактеріологічний метод, а МФА можна віднести до експрес-методів індикації та ідентифікації ентеропатогенних β -гемолітичних *E. coli* в біологічних об'єктах від клінічно здорових сільськогосподарських тварин.

Шига-токсин продукуючі штами *E. coli*, маючи зоонозне походження, можуть спричиняти спалахи захворювань харчового походження і є однією із причин гострої ниркової недостатності в маленьких дітей [134]. Зважаючи на множинність джерел збудників ешерихіозів людини, багатовекторність механізму передачі ентеропатогенних кишкових паличок та особливості третьої ланки епідемічного ланцюга, спричиненої екологічними, соціально-економічними та медико-психологічними впливами на сприйнятливості людини, вивчення будь-якої ланки епідемічного процесу, етіопатогенезу, діагностики, імунопрофілактики, методів та засобів лікування ешерихіозів має важливе значення і є актуальним [18].

В Україні нагальною і затребуваною проблемою є розроблення методів сучасної діагностики, заходів профілактики, засобів та протоколів лікування ешерихіозів, вивчення епідеміологічних особливостей цієї інфекції [18]. Адже в країнах світу епідемічна ситуація щодо ешерихіозів населення напружена, а в більшості країн і маловивчена [13]. Тому ешерихіози становлять актуальну медико-соціальну проблему не лише державам, що розвиваються, але й у високорозвинених країнах [13].

Зважаючи на те, що ентеропатогенні кишкові палички є дуже поширеними в природі серед свійських, домашніх і диких тварин, вони повинні

бути предметом епідеміологічного нагляду та контролю за інфекціями, спричиненими патогенними кишковими паличками, а предмети біотичного та абіотичного характеру довкілля й особливо харчового ланцюга повинні бути об'єктами бактеріологічного моніторингу на предмет наявності в них ентеропатогенних кишкових паличок.

Тому в засобах здійснення цього моніторингу провідне місце повинно бути відведене методу флуоресціюючих антитіл, як одному із найбільш ефективних експрес-методів мікробіологічної індикації та ідентифікації ентеропатогенних *E. coli*.

Відпрацювання всіх технологічних аспектів виготовлення специфічних мічених ешерихіозних глобулінів, методичних прийомів їхнього використання за умови дослідження різних біологічних, зрештою й абіотичних (вода, ґрунт, овочі, фрукти, змиви із поверхні приміщень тощо) матеріалів, дає для спеціалістів діагностичних лабораторій, які працюють у системі контролю «Єдине здоров'я» і відстежують імовірні джерела та шляхи потрапляння ентеропатогенних β -гемолітичних кишкових паличок у продукти харчування на різних ділянках ланцюга «Від поля до столу», високоефективний інструмент, який за своєю діагностичною цінністю не поступатиметься імунофлуоресцентному методу за діагностики сказу [7].

Останнє порівняння взято з багаторічного ефективного застосування реакції імунофлуоресценції у лабораторній діагностиці сказу як метод доказової діагностики, тоді як за діагностики інших інфекційних хвороб цей метод, в силу різних об'єктивних і суб'єктивних причин, не набув такого численного застосування [7].

Широка апробація та верифікація прямого варіанту МФА з метою експрес-індикації та ідентифікації ентеропатогенних *E. coli* допоможе відшліфувати шерехатості запропонованого методу і тим самим довести його застосування до такого рівня, що МФА у прямому варіанті можна буде

вписувати як експрес-метод у Державний стандарт контролю продуктів харчування за наявністю ентеропатогенної кишкової палички.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі результатів моніторингу епідемічної та епізоотичної ситуацій щодо ешерихіозів людини і тварин у різних країнах світу та в Україні, а також результатів власних досліджень, за висновками яких встановлено, що ентеропатогенні β -гемолітичні кишкові палички становлять біоризики інфікування населення через продукти харчування тваринного походження і цим підтверджують основні постулати концепції «Єдиного здоров'я», згідно з якою досягнення оптимальних результатів щодо здоров'я населення можна досягти завдяки спільному, багатовекторному напруженню, що передбачає комплексний підхід до управління епідемічним (епізоотичним) процесом ешерихіозу (колібактеріозу), де визначальною ланкою є своєчасна і точна лабораторна діагностика, що ґрунтується на застосуванні експрес-методів індикації та ідентифікації ентеротоксигенних *E. coli*, включаючи метод флуоресціюючих антитіл як такий, що поєднує в собі об'єктивність мікроскопічного методу та високу специфічність імунологічних реакцій.

1. У роботі виділено, ідентифіковано та вивчено морфологічні ознаки, тинкторіальні, культуральні, біохімічні та біологічні властивості трьох польових ізолятів *E. coli*, два із яких виявилися ентеропатогенними, а один із них – штам (S-EK), який був виділений від 2-місячного поросяти, виявився ентеротоксигенним β -гемолітичним, а тому був відібраний нами як виробничо-контрольний тест-штам, на основі якого були виготовлені вакцинні препарати для імунізації тварин-донорів ешерихіозних сироваток.

2. Вакцинний препарат, який представляв собою 5-мільярдну суспензію мікробних клітин 24-годинної культури тест-штаму на триптон-соєвому дріжджовому бульйоні, інактивованих формальдегідом (0,4% до об'єму культури), концентрованих аеросилом А-300 (3 мг/мл), володів значно вищою антигенною та імуногенною дією на кровотворну та імунну системи організму тварин-донорів, ніж вакцинний препарат, у формі 5-мільярдної суспензії

мікробних клітин 24-годинної культури тест-штаму на триптон-соевому дріжджовому бульйоні, інактивованих кип'ятінням упродовж 1,5 год, концентрованих центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 20 хв із додаванням аеросилу А-300 з розрахунку 3 мг/мл. Так, рівень глобулінів у тварин першої групи, які були імунізовані першим вакцинним препаратом, достовірно зріс на 38,96 %, тоді як у другої групи тварин – на 30,0 %; титр аглютинінів на кінець імунізації у тварин першої групи становив $1:2987 \pm 573$, тоді як у тварин другої групи – $1:800 \pm 160$; бактерицидна активність сироватки крові тварин-донорів першої групи зросла на 33,1%, а у тварин другої групи – на 22,6%; фагоцитарна активність, як і фагоцитарний індекс, зросли у тварин першої групи до $71 \pm 4\%$ (ФА) і $9,7 \pm 1,6$ (ФІ), а у тварин другої групи - до $50 \pm 2\%$ (ФА) і $7,8 \pm 1,1$ (ФІ) ($p \leq 0,05$). Результати дослідження показників крові та сироватки крові тварин-донорів показали, що перший препарат мав значно вищі як антигенні, так й імуногенні властивості, порівняно з другим препаратом, що представляв собою лише О-антиген клітинної стінки тест-штаму.

3. Імунізацією різних видів тварин (коні, велика рогата худоба, вівці та кролі) першим вакцинним препаратом було встановлено, що найвищі титри антитіл виявлено в сироватці крові кролів ($1:9387 \pm 853$) та баранів ($1:8533 \pm 1079$), дещо менші у коней ($1:6827 \pm 1079$) і бугаїв ($1:4693 \pm 427$). Схема імунізації тварин-донорів, що передбачає триразове з інтервалом у 4 доби парантеральне (підшкірне чи внутрішньом'язове) уведення вакцинних препаратів у двократно зростаючих дозах, стимулює утворення достатньо високого рівня аглютинінів і може бути використана для отримання високоактивних ешерихіозних сироваток.

4. Встановлено, що специфічна бичача ешерихіозна сироватка, отримана проти ОН-антигену ентеротоксигенного β -гемолітичного штаму *E. coli*, наділена високою активністю та специфічністю до ОН-антигенів гетерологічних штамів *E. coli*; наявність антитіл до ОН-антигенів

гетерологічних видів бактерій може бути усунена шляхом одноразового адсорбування її суспензією інактивованих клітин гетерологічного виду бактерій, до антигенів якого вона містила найвищий рівень аглютинінів.

5. МФА за чутливістю у чистих культурах не поступається бактеріологічному методу, а у змішаних культурах та у біологічних матеріалах, що обсімінені бактеріями інших видів, значно перевищує його. Діагностичні можливості МФА з метою виявлення та ідентифікації β -гемолітичних *E. coli* у біологічних матеріалах від здорових тварин (фекалії, сеча) і продуктів тваринного походження, таких як молоко і м'ясо із м'ясотуш, значно вищі, ніж бактеріологічного методу.

6. Метод флуоресціюючих антитіл дає можливість протягом 2–3 годин отримати остаточний результат за умови наявності в досліджуваному матеріалі ентеротоксигенних кишкових паличок або на другу добу – у випадку необхідності проведення посівів з подальшою імунофлуоресцентною ідентифікацією виділених культур. Розрахунки економічної ефективності від застосування МФА показали, що впровадження цього методу з метою виявлення та ідентифікації ентеропатогенних *E. coli* за лабораторної діагностики ешерихіозу економія матеріально-грошових затрат становитиме 2 127,05–2 250,55 грн на одне проведене дослідження. Крім економії, МФА прискорить встановлення точного діагнозу, що буде підставою для своєчасної організації та проведення лікувально-профілактичних заходів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Башченко М. І. та ін. Актуальні проблеми біологічної безпеки в контексті реалізації стратегії МЕБ, ВООЗ, ФАО «Єдине здоров'я». *Ветеринарна медицина*. 2016. № 102. С. 14–18.
2. Бегас В. Л., Горбачова В. П. Аспекти правового регулювання принципу «Єдине здоров'я» в Україні. *«Єдине здоров'я»: реалії і перспективи: збірник матеріалів Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції*. Житомир: ПНУ, 2024. С. 6–9.
3. Безверщенко О., Зон Г. Результати вивчення епізоотичної ситуації щодо ешерихіозу при промисловому утриманні індиків. *Ветеринарна медицина*. 2013. № 97. С. 157–160.
4. Біологічні особливості та поширення ізолятів *Escherichia coli*, що викликають ентерити у свиней / Нечипуренко О. О. та ін. *Наукові записки НаУКМА*. 2012. Т. 132. С. 32–40.
5. Біохімічні методи дослідження крові тварин: Методичні рекомендації для лікарів хіміко-токсикологічних відділів державних лабораторій ветеринарної медицини України, слухачів факультетів підвищення кваліфікації та студентів факультету ветеринарної медицини / В. І. Левченко та ін. Київ, 2004. 104 с.
6. Бойко П. К. та ін. Інноваційний вітчизняний продукт «Емкарвак» – вакцина проти емфізематозного карбункулу на ринку ветеринарних імунобіологічних засобів. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*. Серія : Ветеринарні науки. 2019. Т. 21. № 96. С. 19-27. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnuvmbvn_2019_21_96_6_156
7. Бойко О. та ін. Можливості імунофлуоресцентного методу в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб. *Нотатки сучасної*

біології. Луцьк, 2021. № 1 (1). С. 93–102. URL:
<https://doi.org/10.29038/NCbio.21/1.93-101>

8. Гадзало Я. М. Проблема продовольчої безпеки в контексті реалізації спільної стратегії МЕБ, ВООЗ та ФАО «Єдине здоров'я». *Ветеринарна медицина*. 2016. № 102. С. 11–13.
9. Горбаль Н. Імунотерапія для профілактики рецидивуючих бактеріальних інфекцій сечовивідних шляхів/ (За матеріалами медичного форуму Ukraine Nephro-Urology). Медична газета «Здоров'я України 21 сторіччя» 2025. № 11-12. С.: 597-598.
10. Горбаль Н. Лікування неускладнених інфекцій сечових шляхів 2025. Куди прямуємо? (За матеріалами медичного форуму Ukraine Nephro-Urology). Медична газета «Здоров'я України 21 сторіччя» 2025. № 7 (593).
11. Інфекційні хвороби : підручник / О.А. Голубовська, М.А. Андрейчин, А.В. Шкурба та ін.; за ред. О.А. Голубовської. 4-е вид., переробл. та доповн. Київ : ВСВ «Медицина», 2022. 464 с.
12. Каришева А.Ф. Спеціальна епізоотологія : підручник. К.: Вища освіта, 2002. 703 с.
13. Крамарьов С. О., Євтушенко В. В. Ешерихіози: сучасний погляд на проблему. *Педіатрія*. 2016. № 2 (33). С. 34–35.
14. Куртяк Б. М., Бойко О. П., Пундяк Т. О. Застосування реакцій аглютинації та непрямой імунофлуоресценції для ретроспективної діагностики сальмонельозу великої рогатої худоби : Метод. рек. для спеціалістів вет. медицини, науковців та студентів. Львів : ФОП Корпан Б. І., 2013. 20 с.
15. Куртяк Б. М. та ін. Пастерельоз кролів та його профілактика. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*. Серія : Ветеринарні науки. 2018.

- Т. 20. № 83. С. 325-329.
URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnuvmbvvn_2018_20_83_67
16. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло ін. ; За ред. В. В. Влізла. Львів: СПОЛОМ, 2012. 764 с.
 17. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистичні методи в медикобіологічних дослідженнях з використанням Excel. К.: Моріон, 2001. 319 с.
 18. Малиш Н. Г., Чемич М. Д. Діареєгенні ешерихіози: захворюваність, етіологічний пейзаж, фактори ризику. Інфекційні хвороби. 2014. № 3. С 76–82. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/InfKhvor_2014_3_18
 19. Методичні вказівки з курсу «Молекулярні та цитогенетичні основи розвитку організмів» до виконання лабораторних робіт з теми «Біохімічні маркери» / уклад.: С. М. Бойко, Ю. Г. Приседський. Вінниця, 2021. 44 с.
 20. Можливості імунофлуоресцентного методу в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб / О. Бойко та ін. *Нотатки сучасної біології*. 2021. № 1 (1). С. 93–101. URL: <https://doi.org/10.29038/ncbio.21.1.93-101>
 21. Ольховський Є. С. Клініко-імунологічні особливості ешерихіозу у дітей з різною активністю епштейна-барр вірусної інфекції : дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : 14.01.10. Харків, 2018. 171 с.
 22. Пахольчук Т. М. та ін. Гемолітико-уремічний синдром як ускладнення інфекційної діареї у дітей: клінічні випадки. *Сучасна педіатрія. Україна*. 2020. № 3 (107). С. 93–98. URL: <https://doi.org/10.15574/SP.2020.107.93>.
 23. Рябоконт О.В., Ушеніна Н.С., Фурик О.О., Калашник К.В. Диференціальна діагностика гострого діарейного синдрому в клініці інфекційних хвороб : навч. посіб. для студентів – інозем. громадян 5, 6 курсів, мед. ф-тів . Запоріжжя : ЗДМУ, 2019. 78 с.

24. Серологічні методи діагностики бактеріальних та вірусних інфекцій :
Метод. вказівки до проведення лаборатор. занять з курсу «імунологія» /
Т. В. Гудзенко та ін. Одеса : Одес. нац. ун-т ім І. І. Мечникова, 2018. 42 с.
25. Яблонський В. А., Яблонська О. В., Плахтій П. П. Основи наукових
досліджень у тваринництві та ветеринарній медицині. Кам'янець-
Подільський: Медобори, 2001. 244 с.
26. A Systemic Review and Meta-analysis of the Leading Pathogens Causing
Neonatal Sepsis in Developing Countries / D. A. Zelellw et al. *BioMed
Research International*. 2021. Vol. 2021. P. 1–20.
URL: <https://doi.org/10.1155/2021/6626983>
27. Abbott S. L., et al. Biochemical properties of a newly described *Escherichia*
species, *Escherichia albertii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. Vol. 41.
no. 10. P. 4852–4854. URL: <https://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4852-4854.2003>
28. Adhesion of Human and Animal *Escherichia coli* Strains in Association with
Their Virulence-Associated Genes and Phylogenetic Origins / U. Frömmel et
al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013. Vol. 79, no. 19. P. 5814–
5829. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.01384-13>
29. Adherent-invasive *Escherichia coli* Exacerbates Antibiotic-associated
Intestinal Dysbiosis and Neutrophil Extracellular Trap Activation / L. Vong
et al. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2016. Vol. 22, no. 1. P. 42–54. URL:
<https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000591>
30. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease /
C. Palmela et al. *Gut*. 2017. Vol. 67, no. 3. P. 574–587.
URL: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
31. Ajulo S., Awosile B. Global antimicrobial resistance and use surveillance
system (GLASS 2022): Investigating the relationship between antimicrobial
resistance and antimicrobial consumption data across the participating

- countries. PLOS ONE. 2024. Vol. 19, no. 2. P. e0297921. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297921>
32. Androsyk N. N., Lomako Y. V., Karpovich V. K. Some constructive approaches to the creation of an associated vaccine against colibacillosis and proteus infection of calves. Veterinary medicine. Kharkiv: IKEVM. 2003. Issue 82. P. 47–51.
 33. Antibiotic Resistance and Virulence Profiles of Escherichia coli Strains Isolated from Wild Birds in Poland / A. Nowaczek et al. *Pathogens*. 2021. Vol. 10, no. 8. P. 1059. URL: <https://doi.org/10.3390/pathogens10081059>
 34. Antimicrobial resistance and distribution of sul genes and integron-associated intI genes among uropathogenic Escherichia coli in Queensland, Australia / A. Gündoğdu et al. *Journal of Medical Microbiology*. 2011. Vol. 60, no. 11. P. 1633–1642. URL: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034140-0>
 35. Antimicrobial resistance in clinical Escherichia coli isolated from companion animals in Australia / S. Saputra et al. *Veterinary Microbiology*. 2017. Vol. 211. P. 43–50. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.014>
 36. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis / P. Collignon et al. *The Lancet Planetary Health*. 2018. Vol. 2, no. 9. P. e398-e405. URL: [https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(18\)30186-4](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(18)30186-4)
 37. Arshadi N, Mousavi SL, Amani J, Nazarian S. Immunogenic Potency of Formalin and Heat Inactivated *E. coli* O157:H7 in Mouse Model Administered by Different Routes. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2020. Jul-Sep. no 12(3). P.194-200. (URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7368119/?utm_source=chatgpt.com)
 38. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: How closely related are they? / C. EWERS et

- al. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007. Vol. 297, no. 3. P. 163–176. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.01.003>
39. Awad A. The determinants of food insecurity among developing countries: Are there any differences?. *Scientific African*. 2023. Vol. 19. P. e01512. URL: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01512>
 40. AURA Third Australian report on antimicrobial use and resistance in human health.: Australian Commission on Safety and Quality in Health Care (ACSQHC) 2019. URL: <https://www.safetyandquality.gov.au/sites/default/files/2019-06/AURA-2019>
 41. Bacterial travellers' diarrhoea: A narrative review of literature published over the past 10 years / R. López-Vélez et al. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2022. Vol. 47. P. 102293. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102293>
 42. Baquero F, et al. Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere. *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02261>
 43. Beutin L. Escherichia coli as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res*. 1999. Mar-Jun. Vol. 30. no. 2-3. P. 285-298. PMID: 10367359.
 44. Braz V. S., Melchior K., Moreira C. G. Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492>
 45. Brownlie L. E., Grau F. H. Effect of Food Intake on Growth and Survival of Salmonellas and Escherichia coli in the Bovine Rumen. *Journal of General Microbiology*. 1967. Vol. 46, no. 1. P. 125–134. URL: <https://doi.org/10.1099/00221287-46-1-125>
 46. Cattle, weather and water: mapping Escherichia coli O157:H7 infections in humans in England and Scotland / P. Money et al. *Environmental*

- Microbiology*. 2010. Vol 12. no. 10. P. 2633-2644
URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02293.x>
47. Chapman P. A. Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the past 15 years in Sheffield, UK. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*. 2000. Vol. 29:51S-60S. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05332.x>
 48. Characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* among children under 5 years of age with acute diarrhea: a hospital based study / Y. Zhou et al. *BMC Infectious Diseases*. 2018. Vol. 18, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2936-1>
 49. Clinical features, therapeutic interventions and long-term aspects of hemolytic-uremic syndrome in Norwegian children: a nationwide retrospective study from 1999–2008 / G. R. Jenssen et al. *BMC Infectious Diseases*. 2016. Vol. 16, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1627-7>
 50. Clinical Impact of Ceftriaxone Resistance in *Escherichia Coli* Bloodstream Infections: A Multicenter Prospective Cohort Study / P. D. Tamma et al. *Open Forum Infectious Diseases*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac572>
 51. Comparison of *Escherichia coli* Isolates from Humans, Food, and Farm and Companion Animals for Presence of Shiga Toxin–Producing *E. coli* Virulence Markers / S. E. Murinda et al. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2004. Vol. 1, no. 3. P. 178–184. URL: <https://doi.org/10.1089/fpd.2004.1.178>
 52. Comprehensive review of One Health systems for emerging infectious disease detection and management / A. Basheer et al. *One Health*. 2025. Vol. 21. P. 101253. URL: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2025.101253>
 53. Comprehensive Study of Pathogenic Genes Distributed in *Escherichia coli* Isolated from Cattle / Y. Akiyama et al. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. 2015. Vol. 56, no. 3. P. 118–122. URL: <https://doi.org/10.3358/shokueishi.56.118>

54. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes / L. S. Tzouvelekis та ін. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000. T. 14, № 2. C. 137–142. URL: [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(99\)00165-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(99)00165-x)
55. Croxen M. A., Finlay B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 2009. Vol. 8, no. 1. P. 26–38. URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
56. Dale A. P., Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. *The Journal of Infection*. 2015. Vol. 71, no. 6. P. 615–626. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009>
57. Dean P., Kenny B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Current Opinion in Microbiology*. 2009. Vol. 12, no. 1. P. 101–109. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.11.006>
58. Detection and antibiogram profile of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from two abattoir settings in northwest Ethiopia: a one health perspective / S. L. Abey et al. *One Health Outlook*. 2024. Vol. 6, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s42522-024-00102-y>
59. Diarrheagenic *Escherichia coli* / T. A. T. Gomes et al. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016. Vol. 47. P. 3–30. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
60. Diarrheagenic *Escherichia coli* Infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut / J. P. Nataro et al. *Clinical Infectious Diseases*. 2006. Vol. 43, no. 4. P. 402–407. URL: <https://doi.org/10.1086/505867>
61. Disease severity of Shiga toxin-producing *E. coli* O157 and factors influencing the development of typical haemolytic uraemic syndrome: a retrospective cohort study, 2009–2012 / N. Launders et al. *BMJ Open*. 2016. Vol. 6, no. 1. P. e009933. URL: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009933>
62. Dominance of *Escherichia coli* sequence types ST73, ST95, ST127 and ST131 in Australian urine isolates: a genomic analysis of antimicrobial resistance and

- virulence linked to F plasmids / D. Li et al. *Microbial Genomics*. 2023. Vol. 9, no. 7. URL: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001068>
63. Environmental factors affecting indole production in *Escherichia coli* / T. H. Han et al. *Research in Microbiology*. 2011. Vol. 162, no. 2. P. 108–116. URL: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.11.005>
 64. Epidemiology and microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England, 2009–2013 / L. Byrne et al. *Journal of Medical Microbiology*. 2014. Vol. 63, no. 9. P. 1181–1188. URL: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.075895-0>
 65. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002 / Rangel J. M. Et al. *Emerg Infect Dis*. 2005. Apr. Vol. 11, no 4. P. 603–609. URL: <https://doi.org/10.3201/eid1104.040739>
 66. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase and metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in South Asia / K. Islam et al. *Future Microbiology*. 2021. Vol. 16, no. 7. P. 521–535. URL: <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0193>
 67. ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Children with Acute Diarrhea—Antimicrobial Susceptibility, Adherence Patterns and Phylogenetic Background / Franiczek R. et al *Advances in clinical and experimental medicine*. 2012. Vol. 21. P. 187–192.
 68. *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Production / S. Ramos та ін. *Animals*. 2020. T. 10, № 12. C. 2239. URL: <https://doi.org/10.3390/ani10122239>
 69. *Escherichia coli* infections. *CABI Compendium*. 2022. CABI Compendium. URL: <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.83002>
 70. *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999 / G. Johnsen et al.

- International Journal of Food Microbiology*. 2001. Vol. 65, no. 3. P. 193–200. URL: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00518-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00518-3)
71. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 / C. Troeger et al. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018. Vol. 18, no. 11. P. 1211–1228. URL: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30362-1)
 72. Etymologia: *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2015. Vol. 21. no. 8. P. 1310. URL: <https://doi.org/10.3201/eid2108.et2108>
 73. Extended-spectrum beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from humans, animals, and environments in Bangladesh: A One Health perspective systematic review and meta-analysis / M. S. Islam et al. *One Health*. 2023. Vol. 16. P. 100526. URL: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100526>
 74. First detection of VEB-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* clinical isolate in Japan / J. Shindou et al. *Microbiology Spectrum*. 2024. no 12(11):e0052324. URL: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00523-24>
 75. Fleckenstein J.M., Munson G.M., Rasko D.A. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: orchestrated host engagement. *Gut Microbes*. 2013 Vol. 4. no 5. P.392–396. URL: <https://doi.org/10.4161/gmic.25861>
 76. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens / E. Scallan et al. *Emerging Infectious Diseases*. 2011. Vol. 17, no. 1. P. 7–15. URL: <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101>
 77. Fratamico P. M., Sackitey S. K. Wiedmann M., Deng M. Y. Detection of *Escherichia coli* 0157:H7 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol*. 1995. Vol. 33. P. 2188-2191.
 78. Freeman J. T., Anderson D. J., Sexton D. J. Seasonal peaks in *Escherichia coli* infections: possible explanations and implications. *Clinical Microbiology and*

- Infection*. 2009. Vol. 15, no. 10. P. 951–953.
URL: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02866.x>
79. Friedmann H. C. Escherich and Escherichia. *EcoSal Plus*. 2014, Vol. 6. no. 1.
URL: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0025-2013>
 80. Garmendia J., Frankel G., Crepin V. F. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infection and Immunity*. 2005. Vol. 73, no. 5. P. 2573–2585.
URL: <https://doi.org/10.1128/iai.73.5.2573-2585.2005>.
 81. Genetic diversity, virulence genotype and antimicrobial resistance of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) isolated from sows / M. G. Spindola et al. *Veterinary Quarterly*. 2018. Vol. 38, no. 1. P. 79–87.
URL: <https://doi.org/10.1080/01652176.2018.1519321>
 82. Genotypic analysis of Shiga toxin-producing Escherichia coli clonal complex 17 in England and Wales, 2014–2022 / C.-Y. J. Poh et al. *Journal of Medical Microbiology*. 2024. Vol. 73, no. 11:001928.
URL: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001928>
 83. Genotypic and Phenotypic Characteristics Associated with Biofilm Formation by Human Clinical Escherichia coli Isolates of Different Pathotypes / J. Schiebel et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017. Vol. 83, no. 24. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.01660-17>
 84. Global Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli (ExPEC) Lineages / A. R. Manges et al. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019. Vol. 32, no. 3.
URL: <https://doi.org/10.1128/cmr.00135-18>
 85. Health-Economic analyses of diagnostics: guidance on design and reporting / S. van der Pol et al. *PharmacoEconomics*. 2021. Vol. 39, no. 12. P. 1355–1363. URL: <https://doi.org/10.1007/s40273-021-01104-8>
 86. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare Escherichia coli Serotype / L. W. Riley et al. *New England Journal of Medicine*. 1983. Vol. 308, no. 12. P. 681–685. URL: <https://doi.org/10.1056/nejm198303243081203>

87. Holt J. G., Kneg N. R., Sneath P.H. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition. Williams and Wilkins. 1994. URL: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/41848#page/5/mode/1up>
88. In Vitro and In Vivo Model Systems for Studying Enteropathogenic Escherichia coli Infections / R. J. Law et al. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013. Vol. 3, no. 3. P. a009977. URL: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009977>
89. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico / J. J.Varela-Hernández et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2007. Vol. 113, no. 2. P. 237–241. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.028>
90. Isolation of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* including O:157:H7 strains from dairy cattle and beef samples marketed in Calcutta, India / S. Dutta et al. *Journal of Medical Microbiology*. 2000. Vol. 49, no. 8. P. 765–767. URL: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-8-765>
91. Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Cham, 2018. P. 27–50. URL: https://doi.org/10.1007/82_2018_105
92. Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004. no. 2. P. 123–140. URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
93. Karambwe S., Traoré A.N. Potgieter N. Epidemiology of Cefotaxime-Hydrolysing β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Children with Diarrhoea Reported Globally between 2012 and 2022. *Microorganisms*. 2024. Vol. 12. P. 171–76. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010171>
94. Kauffmann F. The bacteriology of Enterbacteriaceae. Copengagen : Munksgaard, 1966. 657 p.

95. Kim YC, Tarr AW, Penfold CN. Colicin import into *E. coli* cells: A model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014. Vol.1843. no. 8. P. 1717–1731. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.010>
96. Krushelnytsky O. D., Ohorodniychuk I. V. Біологічні загрози та їх вплив на епідемічну ситуацію у збройних силах України. *Інфекційні хвороби*. 2021. № 4. С. 56–60. URL: <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2020.4.11897>
97. Kuenzli E. Antibiotic resistance and international travel: Causes and consequences. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2016. Vol. 14, no. 6. P. 595–598. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.11.010>
98. Kurtyak B. M. et al. Autogenous vaccines are an effective means of controlling the epizootic process of mastitis in cows. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2021. Vol. 11. no. 3. P. 145-152. URL: https://doi.org/10.15421/2021_157
99. Laramore C.R., Moritz C.W. Fluorescent antibody technique in detection of *Salmonella* in animal feed and feed ingredients. *Appl. Microbial*. 1969. Vol. 17. no. 3. P. 352–354. URL: <https://doi.org/10.1128/am.17.3.352-354.1969>
100. Lupindua A. M. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in Africa in review. *Southern African Journal of Infectious Diseases*. 2018. no 33(1), P. 24–30. URL: <https://sajid.co.za/index.php/sajid/article/view/31/26>
101. Luppi A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management*. 2017. Vol. 3. no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0063-4>
102. Manges A. R. *Escherichia coli* causing bloodstream and other extraintestinal infections: tracking the next pandemic. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019.

- Vol. 19, no. 12. P. 1269–1270. URL: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(19\)30538-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(19)30538-9)
103. Marques-Garcia F. Methods for Hemolysis Interference Study in Laboratory Medicine - A Critical Review. *EJIFCC*. 2020. Vol. 20, no. 31(1). P. 85-97.
 104. Martin A. J., O'Brien M. Detection of Enteropathogenic *Escherichia coli* in Fecal Cultures by Use of a Modified Fluorescent-Antibody Technique. *Journal of Bacteriology*. 1965. Vol. 89, no. 3. P. 570–573. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.89.3.570-573.1965>
 105. Medical Microbiology. Handbook of Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control; transl. 19th English ed.: in 2 vols. Vol. 1. ed. Michael R. Barer, Will Irving, Andrew Swann, Nelun Perera ; scientific editor. trans.: Serhiy Klymnyuk, Valery Minukhin, Serhiy Pokhil. K.: VSV «Medicine», 2021. 386 p.
 106. Modeling the Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Uncooked, Semidry, Fermented Sausage / T. J. Pond et al. *Journal of Food Protection*. 2001. Vol. 64, no. 6. P. 759–766. URL: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.6.759>
 107. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from an outpatient pediatric population with diarrhea attended in two hospitals from Buenos Aires, Argentina / N. B. Molina et al. *Rev Argent Microbiol*. 2024. Vol. 6, no. 1. P. 8–15. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.06.002>
 108. Mortality in *Escherichia coli* bloodstream infections: a multinational population-based cohort study / M. C. MacKinnon et al. *BMC Infectious Diseases*. 2021. Vol. 21, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06326-x>
 109. Mueller M., Tainter C. R. *Escherichia coli* Infection. [Updated 2023 Jul 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298>

110. Nataro J. P., Kaper J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998. Vol. 11, no. 1. P. 142–201. URL: <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.142>
111. Nguyen Y., Sperandio V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012. Vol. 2. URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00090>
112. Non-typhoid *Salmonella* contributes to gastrointestinal infections in Morogoro: Evidence from patients attending Morogoro regional referral hospital in Tanzania / A. Cuco et al. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2024. Vol. 18. no. 6. P. e0012249. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012249>
113. Occurrence and Antibigram of *Escherichia coli* O157 : H7 in Raw Beef and Hygienic Practices in Abattoir and Retailer Shops in Ambo Town, Ethiopia / N. D. Tadesse et al. *Veterinary Medicine International*. 2021. Vol. 2021. P. 1–12. URL: <https://doi.org/10.1155/2021/8846592>
114. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces and contamination of carcass and various contact surfaces in abattoir and butcher shops of Hawassa, Ethiopia / B. Atnafie et al. *BMC Microbiology*. 2017. Vol. 17, no. 1. P. 24-31. URL: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0938-1>
115. One Health Determinants of *Escherichia coli* Antimicrobial Resistance in Humans in the Community: An Umbrella Review / C. C. H. Smit et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 24. P. 17204. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms242417204>
116. Overview of pathogenic *Escherichia coli*, with a focus on Shiga toxin-producing serotypes, global outbreaks (1982–2024) and food safety criteria / M. A. Alhadlaq et al. *Gut Pathogens*. 2024. Vol. 16, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13099-024-00641-9>
117. Pakbin B., Brück W. M., Rossen J. W. A. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular*

- Sciences*. 2021. Vol. 22, no. 18. P. 9922.
URL: <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
118. Parker J.K., Davies B.W. Microcins reveal natural mechanisms of bacterial manipulation to inform therapeutic development. *Microbiology*. 2022. Vol. 168, no. 4. URL: <https://doi.org/10.1099/mic.0.001175>
 119. Performance of the One Health platform in zoonotic disease surveillance in Guinea / E. F. Bongono et al. *Frontiers in Public Health*. 2025. Vol. 13. URL: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1634641>
 120. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea / J. H. Lee et al. *Letters in Applied Microbiology*. 2015. Vol. 62, no. 1. P. 84–90. URL: <https://doi.org/10.1111/lam.12517>
 121. Poolman J. T., Wacker M. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *Journal of Infectious Diseases*. 2015. Vol. 213, no. 1. P. 6–13. URL: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv429>
 122. Population structure and antibiotic resistance of swine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from China / X. Li et al. *Nature Communications*. 2024. Vol. 15, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50268-2>
 123. Preliminary Incidence and Trends of Infections Caused by Pathogens Transmitted Commonly Through Food – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016–2021 / J. P. Collins et al. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2022. Vol. 71, no. 40. P. 1260–1264. URL: <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7140a2>
 124. Prevalence and characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs and pork products in Umbria and Marche regions of Italy / L. Ercoli et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2016. Vol. 232. P. 7–14. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.002>

125. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant / E. Carney et al. *Food Microbiology*. 2006. Vol. 23, no. 1. P. 52–59. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.12.001>
126. Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. / C. Cagney et al. *Food Microbiology*. 2004. Vol. 21, no. 2. P. 203–212. URL: [https://doi.org/10.1016/s0740-0020\(03\)00052-2](https://doi.org/10.1016/s0740-0020(03)00052-2)
127. Prevalence of Extended-Spectrum- β -Lactamase- and/or Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Yellow-Legged Gulls from Barcelona, Spain / Vergara A. et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016. T. 61, № 2. URL: <https://doi.org/10.1128/aac.02071-16>
128. Prevalence of Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Asia: A Systematic Review and Meta-Analysis / M. Z. Salleh et al. *Antibiotics*. 2022. Vol. 11, no. 10. P. 1333. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101333>
129. Prevalence of the pathobiont adherent-invasive *Escherichia coli* and inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis / B. Nadalian et al. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1111/jgh.15260>
130. Prevalence, phylogeny, and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* pathotypes isolated from children less than 5 years old with community acquired- diarrhea in Upper Egypt / R. M. M. Khairy et al. *BMC Infectious Diseases*. 2020. Vol. 20, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05664-6>
131. Rapid presumptive identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in faecal smears by means of fluorescent antibody: 3. Field evaluation / Cherry W. B. et al. *Bulletin of the World Health Organization*. 1961. Vol. 25, no. 2. P. 159–171. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20604099/>

132. Renter D. G., Sargeant J. M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: epidemiology and ecology in bovine production environments. *Animal Health Research Reviews*. 2002. Vol. 3, no. 2. P. 83–94. URL: <https://doi.org/10.1079/ahrr200245>
133. Review: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water / A. Rani et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2021. Vol. 349. P. 109233. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109233>
134. Risk Factors for the Hemolytic Uremic Syndrome in Children Infected With *Escherichia coli* O157:H7: A Multivariable Analysis / C. S. Wong et al. *Clinical Infectious Diseases*. 2012. Vol. 55, no. 1. P. 33–41. URL: <https://doi.org/10.1093/cid/cis299>
135. Rock C., Donnenberg M. Human pathogenic *Enterobacteriaceae*. *ResearchGate*. 2014. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.00136-7>
136. Rothman K., Greenland S., Lash T. Modern epidemiology. (Third Edition), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2008. 760 p.
137. Russo T. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*. 2003. Vol. 5. no 5. P. 449–456. URL: [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00049-2)
138. Sande C., Whitfield C. Capsules and extracellular polysaccharides in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus*. 2021. Vol. 9. no. 2:eESP00332020. URL: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0033-2020>
139. Schlegel H. General microbiology. *Cambridge University Press*. 1993. 655 p.
140. Seo K. W.; Do K. H.; Lee W. K. Comparative Genetic Characterization of CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolated from Humans and Pigs with Diarrhea in Korea Using Next-Generation Sequencing. *Microorganisms*. 2023. Vol. 11. P.1922.

141. Shiga Toxins as Multi-Functional Proteins: Induction of Host Cellular Stress Responses, Role in Pathogenesis and Therapeutic Applications / M.-S. Lee et al. *Toxins*. 2016. Vol. 8, no. 3. P. 77. URL: <https://doi.org/10.3390/toxins8030077>
142. Sidjabat H. E., Paterson D. L. Multidrug-resistant *Escherichia coli* in Asia: Epidemiology and management. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2015. Vol. 13. P. 575–591.
143. Snowsill T. Modelling the cost-effectiveness of diagnostic tests. *Pharmacoeconomics*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1007/s40273-023-01241-2>
144. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens / B. Liu et al. *FEMS Microbiology Reviews*. 2019. Vol. 44, no. 6. P. 655–683. URL: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>
145. Surveillance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico / A. Canizalez-Roman et al. *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01924>
146. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects / J. D. van Elsas et al. *The ISME Journal*. 2010. Vol. 5, no. 2. P. 173–183. URL: <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>
147. The emerging importance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England / B. Vishram et al. *Journal of Medical Microbiology*. 2021. Vol. 70, no. 7. URL: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001375>
148. The Food and Agriculture Organization (FAO). URL: <https://latifundist.com/kompanii/1044-the-food-and-agriculture-organization>
149. The Immunogenicity and Properties of a Whole-Cell ETEC Vaccine Inactivated with Psoralen and UVA Light in Comparison to Formalin /

- M. M. Westcott et al. *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, no. 8. P. 2040.
URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082040>
150. The population genetics of commensal *Escherichia coli* / O. Tenaillon et al. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. Vol. 8, no. 3. P. 207–217.
URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
 151. The survival of *Escherichia coli* upon exposure to irradiation with non-coherent polychromatic polarized light / D. Djurdjevic-Milosevic et al. *Veterinárni Medicina*. 2011. Vol. 56, no. 10. P. 520–527.
URL: <https://doi.org/10.17221/3297-vetmed>
 152. Todar K. Pathogenic *Escherichia coli*. *Online Textbook of Bacteriology* [Електронний ресурс]. Available from: <https://www.scribd.com/document/374847410/Todars-Online-Textbook-of-Bacteriology-pdf>
 153. Truskova T.Yu. Etiological role of enterobacteria in the occurrence of infectious diseases of farm poultry. *Veterinary medicine*. Kharkiv: IKEVM. 2003. Is. 82. P. 606–609.
 154. Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli* Strains – New Strategies for an Old Pathogen / Zagaglia C. *Microorganisms*. 2022. Vol. 10, no. 7. P.1425. DOI: 10.3390/microorganisms10071425.
 155. Ushkalov V. O. et al. Results of laboratory and field tests of a vaccine against edematous disease of piglets. *Veterinary Medicine*. Kharkiv: IKEVM. 2003. Is. 82. P. 629–632.
 156. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports / J. Sarowska et al. *Gut Pathogens*. 2019. Vol. 11, no. 1.
URL: <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
 157. Virulence Profiles, Phylogenetic Background, and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Turkeys with Airsacculitis/ M. P. V. Cunha

- et al. *The Scientific World Journal*. 2014. Vol. 2014. P. 1–8. URL: <https://doi.org/10.1155/2014/289024>
158. Wafaa Fadhil Hamad. Genotypic and phenotypic study of *E. coli* isolated from children suffering from severe diarrhea with some antibiotic resistant gene. *World Journal of Advanced Research and Reviews*. 2022. Vol. 15, no. 1. P. 683–693. URL: <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.15.1.0758>
 159. Wagner W., Vogel M., Goebel W. Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. *Journal of Bacteriology*. 1983. Vol.154. no. 1. P. 200–210. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.154.1.200-210.1983>
 160. Wang L, Rothmund D, Curd H, Reeves PR. Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-Antigen) gene. *Journal of Bacteriology*. 2003. Vol. 185. no. 9. P. 2936–2943. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.185.9.2936-2943.2003>
 161. Whitaker J. Rapid identification of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:B8 by the fluorescent antibody technique. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 1958. Vol. 95, no. 1. P. 1. URL: <https://doi.org/10.1001/archpedi.1958.02060050003001>
 162. Wild boar as a reservoir of antimicrobial resistance / R. T. Torres et al. *Science of The Total Environment*. 2020. Vol. 717. P. 135001. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135001>
 163. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance / L. E. Furness et al. *Environmental Research*. 2017. Vol. 154. P. 28–34. URL: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.014>
 164. Wilks S. A., Michels H., Keevil C. W. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *International Journal of Food Microbiology*. 2005. Vol. 105. no. 3. P. 445–454. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.021>

165. Wullt B. Erratum to «The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract». *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003. Vol. 21. no. 6. P. 605–621. URL: [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(02\)00328-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(02)00328-x)
166. Yankovskyi D. S., Shyrobokov V. P., Dymant H. S. Мікробіом у фізіології людини. Інфекційні хвороби. 2018. № 3. С. 5–17. URL: <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2018.3.9407>
167. Zilberberg M. D., Shorr A. F. Secular trends in gram-negative resistance among urinary tract infection hospitalizations in the United States, 2000-2009. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013. No 34. P. 940–946. URL: <https://doi.org/10.1086/671740>

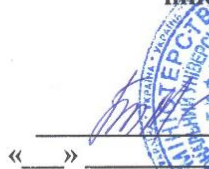
ДОДАТКИ

Додаток А.1

Погоджено
Проректор з науково-педагогічної роботи
та цифрової трансформації
д. пед. н., професор


Олена ГЛАЗУНОВА
«18» 10 2025 р.

Затверджую
Проректор з наукової роботи та
інноваційної діяльності,
д. с.-т. н., професор


Оксана ТОНХА
«__» __ 2025 р.



А К Т
про впровадження / використання результатів
дисертаційної роботи у освітній процес

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи «Імунофлуоресцентна індикація та ідентифікація ентеропатогенних штамів *Escherichia coli* в біотичних та абіотичних об'єктах довкілля» Поручинського Богдана Андрійовича здобувача наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» Волинського національного університету ім. Лесі Українки, які опубліковані у відкритих виданнях України, що входять до переліку фахових видань МОН України, прийняті до використання в навчальному процесі для проведення лекційних і лабораторних занять із дисциплін «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин», «Ветеринарна мікробіологія та імунологія» зі студентами 5-6-го і 2-го курсів відповідно та наукових дослідженнях на кафедрі ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України.

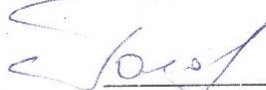
Матеріали розглянуті та схвалені на засіданні кафедри ветеринарної епідеміології та охорони здоров'я тварин (протокол № 9 від 18.10.2025).

Декан факультету ветеринарної
медицини, к.вет.н., доцент

Директор НДІ здоров'я тварин
д.вет.н., професор

Завідувач кафедри ветеринарної
епідеміології та охорони здоров'я тварин,
к.вет.н., доцент


Олександр ВАЛЬЧУК


Сергій ГОЛОПУРА


Володимир МЕЛЬНИК

Додаток А.2

Львівський національний університет
ветеринарної медицини та
біотехнологій
імені С.З. Гжицького

ДОВІДКА

Видана про те, що матеріали дисертаційної роботи *Поручинського Богдана Андрійовича* на тему: «Імунофлуоресцентна індикація та ідентифікація ентеропатогенних штамів *Escherichia coli* в біотичних та абіотичних об'єктах довкілля», подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія, використовуються у начальному процесі кафедри епізоотології при викладанні таких дисциплін: «Епізоотологія та інфекційні хвороби», «Державний ветеринарний контроль та нагляд».

Завідувач кафедрою епізоотології,
доктор ветеринарних наук,
професор

Підпис завірено

Начальник відділу кадрів
ЛНУВМтаБТ імені С.З. Гжицького



ВІДПОВІДАЮЧІЙ
НАЧАЛЬНИК ВІДДІЛУ КАДРІВ
ЛЬВІВСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ
ІМЕНІ С.З. ГЖИЦЬКОГО

О.П. ГЕНТОШ

Додаток А.3



Затверджую

Ректор Поліського
національного університету
Олег СКИДАН

« 24 » 11 2025 р.

М.П.

А К Т

про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що матеріали дисертаційної роботи «Імунофлуоресцентна індикація та ідентифікація ентеропатогенних штамів *Escherichia coli* в біотичних та абіотичних об'єктах довкілля» Поручинського Богдана Андрійовича здобувача наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» Волинського національного університету ім. Лесі Українки, які опубліковані у відкритих виданнях України, що входять до переліку фахових видань МОН України, прийняті до використання в навчальному процесі для проведення лекційних і лабораторних занять із дисциплін «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин», «Ветеринарна мікробіологія та імунологія» зі студентами 5-6-го і 2-го курсів відповідно та наукових дослідженнях на кафедрі ветеринарної епідеміології Поліського національного університету.

Матеріали розглянуті та схвалені на засіданні кафедри ветеринарної епідеміології (протокол №4 від 24.11.2025 р.).

Завідувач кафедри ветеринарної епідеміології,
доктор ветеринарних наук, професор

Олександр ГАЛАТЮК

Секретар, кандидат ветеринарних наук,
доцент

Діана ФЕЩЕНКО

Додаток А.4

Проректор з науково-педагогічної роботи
та міжнародної співпраці
Волинського національного університету

імені Лесі Українки
Поліна Єлісеєва
2025 р.



АКТ

Про впровадження/використання результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Цим актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Імунофлуоресцентна індикація та ідентифікація ентеропатогенних штамів *Escherichia coli* в біотичних та абіотичних об'єктах довкілля», що виконана Поручинським Богданом Андрійовичем і представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії із спеціальності 091 Біологія, впроваджені у навчальний процес при викладанні освітніх компонентів «Мікробіологія, вірусологія та імунологія» та «Діагностика інфекційних хвороб» та використовуються в наукових дослідженнях кафедри гістології та медичної біології медичного факультету Волинського національного університету імені Лесі Українки.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри гістології та медичної біології, протокол №3 від «18» листопада 2025 р.

Декан медичного факультету,
кандидат біологічних наук, доцент



Ярослав СТЕПАНЮК

Завідувач кафедри гістології
та медичної біології,
доктор ветеринарних наук, професор



Петро БОЙКО

Додаток А.5**ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ****ІМЕНІ ЛЕСІ УКРАЇНКИ**

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

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**Луцьк - 2025**

УДК 616. 98:579.842.11

Рекомендовано до друку методичною радою
Волинського національного університету імені Лесі Українки
(протокол № 4 від 17.12.2025 року)

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

Рецензенти:

Мотузюк О. П., кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізіології людини і тварин Волинського національного університету імені Лесі Українки

Войтюк В. П., кандидат сільськогосподарських наук доцент кафедри лісового та садово-паркового господарства Волинського національного університету імені Лесі Українки

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.

УДК 616. 98:579.842.11

© Бойко П.К.

© Бойко О.П.

© Панівська О.В.

© Поручинський Б.А.

© Волинський національний
університет імені Лесі Українки, 2025

ЗМІСТ

1.	ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ	4
2.	ВИГОТОВЛЕННЯ ВИДОСПЕЦИФІЧНИХ ГЛОБУЛІНІВ ПРОТИ ЕНТЕРОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ <i>E. COLI</i>	5
2.1.	Підбір виробничо-контрольного штаму для виготовлення антигенів і порядок роботи з ними	5
2.2.	Виготовлення антигену для імунізації тварин-донорів	7
2.3.	Імунізація тварин-донорів і отримання сироваток проти ентеропатогенних штамів <i>E. coli</i>	8
2.4.	Контроль якості сироватки	9
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>	11
2.7.	Виготовлення флуоресціюючих глобулінів проти ентеропатогенних штамів <i>E. coli</i>	14
2.8.	Контроль якості та умови зберігання мічених глобулінів ...	16
3.	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	17

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 імунофлуоресцентної 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 штаму для виготовлення антигенів може бути використаний будь-який ентеропатогенний штаму *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 штаму *E. coli* має відповідати таким критеріям: це грамнегативні, дрібні, прямі або злегка зігнуті палички із заокругленими кінцями, що розташовуються переважно поодиноці або парами, не утворюють спор чи капсул. Після 18–24 год. культивування на МПБ при 37°C штаму 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-арабітіолу, целобіози, α-метил-D-

глюкозиду, інозиту 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 см^3 у пробірці) або на МПА (по 15 мл у чашці Петрі). Посіви інкубують при 37 °C.

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 проводять 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 спливли, видаляють, а осад повторно суспендують у свіжій воді. Процедуру повторюють доти, поки не перестануть з'являтися на поверхні дрібні частинки. Після завершення процесу замочування сефадексу 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 сул 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 0,15 М 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°C 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°C 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 я 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°C 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. Безверщенко 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. Enterohaggregative *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.