

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології, а саме до способу визначення термостабільного (ST) ентеротоксину *E.coli* за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА).

Запропонований до розробки спосіб дає можливість швидкої прижиттєвої діагностики ентеротоксичної форми колибактеріозу у тварин і дозволяє визначати термостабільний ентеротоксин у концентраціях не менше ніж 1нг/мл.

Простота та висока швидкість дозволяє використовувати цей спосіб у випадку необхідності безпосередньо у зонах масових захворювань ентеротоксичною формою колибактеріозу, викликану штамми *E.coli* продукуєними термостабільний ентеротоксин.

У теперішній час виявлення токсигенних кишкових паличок продукуєних термостабільний ентеротоксин здійснюється за допомогою таких способів, як твердофазний радіоімунологічний, гангліозид-імуоферментний, культурально-клітинні дослідження (цитотоксичність), визначення термостабільного ентеротоксину на 15-денних курячих ембріонах та анальна проба на мишах-смоктунах [Колібактеріоз телят. Зароза В.Г., 1991]. Відомих способів не достатньо для діагностики ентеротоксичної форми колибактеріозу, викликані штамми кишкової палички продукуєними термостабільний ентеротоксин, а існуючі є більш трудомісткими дорогокоштуючими, важковідтворюваними, дефіцитними за використовуваними реагентами, не специфічними, не володіючими достатньою чутливістю, а деякі з них не відповідають вимогам етики по відношенню до тварин.

На сьогоднішній день на ринку відсутні сучасні високоефективні діагностичні набори, які дозволяють проводити експрес-аналіз прижиттєвого визначення термостабільного ентеротоксину у культуральних рідинах штамів *E.coli* і екскрементах, виділених від хворих тварин при ентеротоксичній діареї. В існуючий час у різних країнах ведуться розробки по створенню ІФА-тест-систем і діагностиків для визначення ентеротоксинів *E.coli*.

Відомий спосіб за допомогою тест-системи для імуоферментного якісного визначення термолабільного ентеротоксину *E.coli*, [Інструкція на применення Тест-системи для імуоферментного качественного определения термолабільного энтеротоксина *E. Coli* (НИР ГУ НИИ морфологии человека РАМУ-2000г.)]. За цим способом проводять, імунізацію кон'югатів термолабільним та термостабільним ентеротоксинами, отримують антитоксичну сироватку, осаджують імуноглобулінову фракцію сульфатом амонію, відокремлюють супернатант центрифугуванням при 6000об/хв. Цей спосіб може бути найближчим аналогом.

Недоліком існуючого способу є те, що у зв'язку з відсутністю антигенних властивостей у термостабільного ентеротоксину *E.coli* (гаптен), отримати специфічні імуноглобуліни, на відміну від термолабільного ентеротоксину, практично неможливо, а також недоліком є те, що ця тест-система розроблена не в Україні.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення термостабільного (ST) ентеротоксину *E.coli* за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу, що включає одержання термолабільного та термостабільного ентеротоксину, кон'югацію цих ентеротоксинів, імунізацію тварин, отримання антитоксичної сироватки, виділення імуноглобулінової фракції, іммобілізації полістиролових планшетів, шляхом використання гаптenu як термостабільного ентеротоксину, який приєднують до носія з більшою молекулярною масою, щоб забезпечити ефективність способу визначення термостабільного (ST) ентеротоксину *E.coli* за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу.

Використання кон'югату ентеротоксинів *E.coli* дозволяє отримати авідні антитіла яким притаманна висока афінність до термолабільного ентеротоксину *E. coli* гомологічного і гетерологічних штамів.

Спосіб виконується таким чином:

Від кролів гіперімунізованих кон'югатом термолабільного і термостабільного ентеротоксинів отримують антитоксичну гіперімунову сироватку крові, осаджують імуноглобулінову фракцію сироватки сульфатом амонію, відокремлюють супернатант центрифугуванням при 6000об/хв. протягом 30 хвилин, проводять діаліз для виділення сульфат-йонів, антитоксичну імуноглобулінову фракцію перерозчинюють у фосфатно-солевому буфері, рН7,3. Після чого проводять сенсibiliзацію 96-луночних планшетів. В усі лунки планшету вносять по 0,1мл розчину антитоксичних (ST) імуноглобулінів. Планшет накривають кришкою і поміщають на три години у термостат при температурі 37°C, або на ніч у холодильник при 4°C. Вилучають вміст лунок витрушуванням, промивають двічі розчином фосфатного буферу з твіном-20, рН7,3 і чотири рази - розчином фосфатно-солевого буферу, але без твіну-20.

Готують стандартні розведення термостабільного ентеротоксину *E.coli* з початковою концентрацією 10нг/мл. Беруть вісім двійних розведень ST-ентеротоксину у фосфатно-солевому буфері так, щоб отримати інтервал концентрацій від 10 до 0,08нг/мл. Для цього у лунку А2 вносять 200мкл розчину ентеротоксину з концентрацією 10нг/мл, а в інші лунки до Н2 - по 100мкл розчину фосфатного буферу. Потім по 100мкл з лунки А2 розтитувають до Н2 для отримання вказаних розведень. Рядки а1, b1, c1, d1, e1, f1, g1, h1 використовують у якості контролю, вносячи у них усі компоненти, крім стандартів ST-ентеротоксину.

Кожний зразок, який аналізують (по 0,1мл) вносять у дві лунки. Планшет інкубують 30 хвилин при температурі 37°C, промивають карбонат-бікарбонатним буферним розчином з рН9,6.

У кожен лунку вносять по 0,1мл розчину, який містить мишачі антикроячі антитоксини кон'юговані з пероксидазою хріна за методом Nakane and Kawaoi, (1974), інкубують планшети 30хв. при температурі 37°C і промивають двічі розчином фосфатно-солевого буферу, рН7,3, який містить твін-20, і чотири рази розчином тогож буферу, але без твіну-20. В усі лунки вносять по 0,1мл розчину, який містить індикаторну субстратну суміш такого складу: кислота лимонна, натрій фосфорнокислий двоамінений, 12-водний, ортофенілендіамін, перекис водню. У мірній колбі вмістом 25мл змішують 6,1мл розчину лимонної кислоти з концентрацією 0,1моль/л (1,92г. розчиняють і доводять до 100мл дистильованою водою) і 6,4мл розчину двоаміненого фосфорнокислого натрію з концентрацією 0,2моль/л (7,16г натрія фосфорнокислого розчиняють у 100мл дистильованої води). Після змішування об'єм отриманого розчину доводять до 25мл дистильованою водою, рН розчину повинен бути 5,0. Зберігають готовий нітратно-фосфатний буферний розчин не більше трьох діб при температурі 5±2°C. Безпосередньо перед використанням 10мл отриманого розчину переносять у флакон, розчиняють у ньому 2мг ортофенілендіаміну і додають 15мкл концентрованого (30%) розчину перекису водню.

Інкубують планшети 15-20 хвилин при температурі 20°C. Візуально позитивні проби зафарбовуються у жовто-гарячий колір. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену. В усі лунки додають по 0,1мл зупиняючого реакцію розчину сірчаної кислоти з концентрацією 2моль/л. Облік результатів проводили візуально або інструментально на реєструючому фотометрі при 492нм.

Приклад 1.

Візуальний облік. Проводили порівняння інтенсивності забарвлення лунок з досліджуваними пробами з інтенсивністю забарвлення лунок титрованого стандарту термостабільного ентеротоксину E.coli і контролю. Кількісний вміст термостабільного ентеротоксину у пробах буде відповідати концентрації стандарту токсину у лунці з однаковою інтенсивністю забарвлення при безкольоровому контролі.

Приклад 2.

Інструментальний облік - кількісний вміст термостабільного ентеротоксину у пробі буде відповідати граничному розведенню стандарту токсину у лунках, де оптична щільність проби і стандарту вдвічі перевищує поглинання у контролі, але при значеннях оптичної щільності не менше ніж 0,1см³.

Використання кон'югату ентеротоксинів E.coli дозволяє отримати авідні антитіла, яким притаманна висока афінність до термостабільного ентеротоксину E.coli гомологічного і гетерологічних штамів.