

МІКРОБІОЛОГІЯ, ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 616.15:[636.03:57.01

Підбір тварин-донорів для виготовлення імунних ешерихіозних діагностичних сироваток**Поручинський Б.А., Бойко П.К.***Волинський національний університет імені Лесі Українки*

Поручинський Б.А. E-mail: poruchynskyi.bohdan@vnu.edu.ua



Поручинський Б.А., Бойко П.К. Підбір тварин-донорів для виготовлення імунних ешерихіозних діагностичних сироваток. Науковий вісник ветеринарної медицини, 2025. № 1. С. 67–74.

Poruchynskyi B., Boyko P. Selection of donor animals for the production of immune diagnostic sera against escherichiosis. *Nauk. visn. vet. med.*, 2025. № 1. PP. 67–74.

Рукопис отримано: 29.03.2025 р.

Прийнято: 12.04.2025 р.

Затверджено до друку: 22.05.2025 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2025-196-1-67-74

Стратегія «Єдине здоров'я» передбачає контроль всіх процесів за виробництва харчових продуктів у ланцюгу «від поля до столу». Виявлення біотоксикантів, зокрема ентеротоксигенних кишкових паличок, можна здійснювати різними методами. Однак жоден з них не можна віднести до експрес-методів. Метод флуоресціюючих антитіл (МФА), який поєднує в собі об'єктивність мікроскопічного методу та високу специфічність імунологічних реакцій, можна застосувати з цією метою.

Аналіз звітів (FAO) свідчить, що контроль за наявністю ентеропатогенних кишкових паличок – важлива складова стратегії «Єдине здоров'я». Розробка експрес-методів індикації та ідентифікації ентеротоксигенних кишкових паличок є актуальною темою наукових пошуків. До таких можна віднести МФА. Діагностична ефективність МФА залежить від активності та специфічності ешерихіозних сироваток, що, зокрема, залежить від тварин-донорів, схем імунізації та антигенності вакцинних препаратів.

Мета досліджень – дати порівняльну оцінку двох схем імунізації різних видів тварин вакцинним препаратом із інактивованих мікробних клітин *E. coli*.

Як вакцинний препарат використано 5-мільярдну суспензію 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).

Як тварин-донорів використано кролів, баранів, бугаїв та копей, по 6 голів кожного виду, підібраних за принципом аналогів (за віком, живою масою та умовами утримання і годівлі). Усі тварини були клінічно здорові.

Використано дві схеми імунізації тварин. За першої схеми імунізації вакцинний препарат вводили підшкірно триразово, а за другої – чотириразово, з інтервалом 4 доби у 2-кратно зростаючих дозах. Збір крові для дослідження проводили на 21-шу добу після останнього введення вакцинного препарату.

Рівень аглютинінів визначали у реакції аглютинації (РА). Як антиген використали 2-мільярдну суспензію інактивованих клітин *E. coli*. РА ставили в об'ємі 1 см³. За титр приймали останнє розведення сироватки, в якому спостерігали аглютинацію не менше як на 2 плюси.

Найвищі титри аглютинінів виявлено в сироватці крові кролів – 1:7253±1389 (за першої схеми імунізації) і 1:9387±853 (за другої схеми). Дещо нижчі титри антитіл виявлено в сироватці крові баранів – 1:5547±1028 (за першої схеми) і 1:8533±1079

(за другої схеми) та коней – $1:5973 \pm 1428$ і $1:6827 \pm 1079$, відповідно, а найнижчі – в сироватці крові бугаїв – $1:4267 \pm 540$ (перша схема) і $1:4693 \pm 427$ (друга). Це свідчить, що на один і той же антиген імунна система різних видів тварин реагує по-різному.

Встановлено, що різниця у рівнях аглютининів між другою і першою схемами імунізації в овець становить 35 %, у кролів – 22,8 %, в коней – 12,5 % і ВРХ – 9,1 %. Отже, четверте уведення препарату підсилює гуморальну відповідь в імунізованих тварин. Проте, воно призводить до розвитку стресу і сенсibiliзації у тварин. Тому, для отримання активних ешерихіозних сироваток достатньо триразового уведення препарату.

У процесі імунізації ешерихіозним антигеном найвищі титри аглютининів були 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, що передбачає триразове з інтервалом у 4 доби парантеральне уведення вакцинних препаратів у двократно зростаючих дозах, стимулює високий рівень аглютининів, не спричиняє стресу, а тому може бути використана для отримання високоактивних ешерихіозних сироваток.

Ключові слова: ентеротоксигенні кишкові палички, схеми імунізації, вакцинні препарати, тварини-донори, реакція аглютинації, антигени бактерій.

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Міжнародна стратегія «Єдине здоров'я» передбачає державний санітарний контроль всіх технологічних процесів з виробництва продуктів агропромислового комплексу. В цьому ланцюгу «від поля до столу» є низка критичних точок, де може відбуватися забруднення продовольчої сировини та харчових продуктів різноманітними токсикантами синтетичного чи біогенного походження [1]. Одним із важливих біологічних токсикантів є ентеропатогенні кишкові палички. Виявляти та ідентифікувати їх можна різними методами – бактеріологічним, імунологічним та молекулярно-генетичним. Проте, кожний з них має свої недоліки, що не дозволяє віднести їх до експрес-методів. Таких недоліків позбавлений метод флуоресціюючих антитіл, який поєднує в собі об'єктивність мікроскопічного методу та високу специфічність імунологічних реакцій.

Аналіз звітів Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) та наукової літератури свідчить, що ентеропатогенні кишкові палички становлять важливу медико-епідеміологічну та ветеринарно-санітарну складову стратегії «Єдине здоров'я» [2, 3].

Збір, аналіз і систематизація даних щодо забрудненості кормів і продукції тваринництва залишками агрохімікатів, лікувально-профілактичними препаратами, різноманітними токсичними речовинами та біотичними контамінантами – одні з основних завдань, що передбачені цією стратегією [3–5].

До біотичних контамінантів, які становлять серйозну загрозу здоров'ю людей, відносять низку токсиковарів ентеропатогенних та ентеротоксигенних штамів кишкової палички [6–8].

Тому, розробка експрес-методів індикації та ідентифікації ентеропатогенних та ентеротоксигенних штамів кишкової палички є актуальною темою наукових пошуків [9, 10]. Таким, на нашу думку, може бути метод флуоресціюючих антитіл (МФА), який зарекомендував себе як один із перспективних експрес-методів [11, 12]. За умов діагностичної ефективності він може стати не лише сигнальним методом виявлення в матеріалах біотичного та абіотичного походження ентеротоксигенних кишкових паличок, а також в багатьох випадках фінальним етапом їх ідентифікації, що дозволить значно скоротити терміни бактеріологічних досліджень, це матиме вагомий епідеміологічний та економічний значення [13–16].

Для успішної індикації та ідентифікації ентеротоксигенних штамів кишкової палички за допомогою реакції імунофлуоресценції необхідно, щоб імунні сироватки від поверхневих антигенів *E. coli* мали високу активність та специфічність [17–19]. Отримати такі сироватки можливо за старанного підбору тварин-продуцентів, схем імунізації із застосуванням активних і типових в антигенному значенні культур тест-штамів кишкової палички [20, 21].

Мета дослідження – дати порівняльну оцінку двох схем імунізації різних видів тварин (коні, велика рогата худоба, вівці та кролі) вакцинним препаратом, що являє собою суспензію інактивованих формальдегідом мікробних клітини 24-годинної культури ентеротоксигенного штаму *E. coli*, які містили поверхневі антигенні детермінанти (H-, K- і O-антигени) та анатоксин.

Матеріал і методи дослідження. Як вакцинний препарат використано 5-мільярдну суспензію 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). До інактивації культура являла собою рухливі поліморфні грамнегативні палички розміром 0,8–1×2–5 мкм.

Як тварин-донорів використано кролів породи шиншила віком 6 місяців, масою 3±0,3 кг; баранів породи прекос віком 6±0,5 місяців; бугайців віком 6 місяців; коней віком 2±0,5 роки. Усі тварини 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 і годівлі). Кролі належали регіональній лабораторії Держпродспоживслужби, а інші види тварин – ТОВ «Городище-2» Луцького району Волинської області.

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. 1). Зокрема, 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. 1). Забір крові для дослідження на вміст аглютининів у сироватці крові проводили на 21-шу добу після останнього (третього) введення вакцинного препарату або на 30-ту добу після початку імунізації (перша схема імунізації) та на 21-шу добу після останнього (четвертого) введення вакцинного препарату або на 34-ту добу після початку імунізації (друга схема імунізації).

Рівень аглютининів у сироватці крові визначали у розгорнутій реакції аглютинації (РА) [22]. Як антиген для РА використовували 2-мільярдну суспензію інактивованої формальдегідом культури *E. coli*, з якої були виготовлені вакцинні препарати для імунізації тварин-донорів. РА ставили у полістиролових 96-гніздних планшетах в об'ємі 1 см³. На забуференому до рН 7,40,85 % розчині натрію хлориду (ЗФР) готували розведення сироваток, починаючи із розведення 1:5. До 0,5 см³ розведеної сироватки додавали по 0,5 мл антигену, старанно перемішували і витримували за 37±0,5 °С впродовж 3±0,5 год, надалі за кімнатної температури – 18±2 год, і оцінювали реакцію в плюсах. За титр антитіл приймали останнє розведення сироватки, в якому спостерігалась аглютинація з оцінкою не менше як на 2 плюси.

Результати дослідження. У своїй роботі ми намагалися врахувати досвід інших дослідників, які займалися виготовленням імунних діагностичних препаратів та досвід, отриманий із результатів попередніх власних досліджень, а також враховуючи наші можливості щодо проведення таких досліджень на різних видах тварин. Результати досліджень наведено у таблиці 2.

Таблиця 1 – 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				
Коні	1-ша; 2,5	5-та; 5,0	9-та; 10,0	30-та; забір*	1-ша; 1,0	5-та; 2,0	9-та; 5,0	13-та; 10,0	34-та; забір**
ВРХ	1-ша; 2,5	5-та; 5,0	9-та; 10,0	30-та; забір	1-ша; 1,0	5-та; 2,0	9-та; 5,0	13-та; 10,0	34-та; забір
Вівці	1-ша; 1,0	5-та; 2,0	9-та; 4,0	30-та; забір	1-ша; 0,5	5-та; 1,0	9-та; 2,0	13-та; 4,0	34-та; забір
Кролі	1-ша; 0,5	5-та; 1,0	9-та; 2,0	30-та; забір	1-ша; 0,5	5-та; 1,0	9-та; 2,0	13-та; 4,0	34-та; забір

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

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

Таблиця 2 – 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 таблиці 2 дані свідчать про те, що на один і той же вакцинний препарат (антиген) імунна система різних видів тварин реагує по-різному. Тому підбір тварин-донорів з метою виготовлення високоактивних імунних сироваток має важливе значення.

Водночас рівні антитіл у сироватці крові різних видів тварин за різних схем їх імунізації однотипним антигенним препаратом достовірно різняться між собою.

Обговорення. Як відомо із наукових джерел, активність та специфічність антитільних діагностиків для імунологічних реакцій (РНГА, РА, РІФ, РП тощо), насамперед, визначається специфічною активністю імунних сироваток [23, 24]. Зокрема на активність імунних сироваток впливають такі чинники як антигенність вакцинних препаратів, взятих для імунізації, вид тварин-донорів, схеми імунізації [25, 26].

Різниця у рівнях антитіл між другою і першою схемами імунізації в овець становить 35 %, кролів – 22,8 %, коней – 12,5 % і ВРХ – 9,1 %. Очевидно, що четверте уведення 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. Наші дослідження узгоджуються із результатами досліджень інших дослідників, які вважають, що активність імунних сироваток залежить, насамперед, від дози та кратності уведення антигену [27, 28].

Проте, слід зазначити, що у всіх коней і кролів, а також у половини, взятих у дослід, бугаїв і баранів четверте введення вакцинного препарату спричинило підвищення страху перед уведенням препарату – тварини збуджено реагували на їх фіксацію, тремтіли. У тварин цієї групи на місці уведення 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 уведення вакцинного препарату у різко зростаючих дозах спостерігається сенсibilізація організму антигенними детермінантами, що входили до складу вакцинного препарату.

Зважаючи на те, що четверте уведення препарату призводить до стресового стану організму імунізованих тварин як на імунологічному (розвиток сенсibilізації), так і невротичному (розвиток боязні до проведення ветеринарних процедур зокрема й ін'єкцій) рівнях, вважаємо, що для отримання високоактивних сироваток достатньо триразового уведення вакцинного препарату.

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. У процесі імунізації однотипним антигенним препаратом найвищі титри антитіл виявлялися 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).

2. Імунізація тварин-донорів за схемою, що передбачає чотириразове парантеральне уведення вакцинного препарату у двократно зростаючих дозах стимулює накопичення вищого рівня аглютининів в сироватці крові імунізованих тварин всіх чотирьох видів, які були взяті у дослід. Проте, четверте уведення антигену спричиняє в імунізованих тварин виникнення проявів сенсibilізації організму та стресового стану.

3. 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 аглютининів і може бути використана в подальшій роботі для отримання високоактивних імунних сироваток.

Подяки. Висловлюємо щире вдячність:

– директору ТОВ «Городище» **Никонюку Анатолію Олександровичу** за представлену можливість провести дослід з порівняльного

вивчення схем імунізації тварин на конях, великій рогатій худобі та вівцях, а також спеціалістам господарства – головному зоотехніку **Богоносу Олександру Володимировичу**, ветеринарному спеціалісту **Кізицькому Віталію Миколайовичу** та завідувачці фермою **Верхорубовій Людмилі Павлівні** за безпосередню допомогу та сприяння в проведенні дослідів на тваринах;

– директору регіональної лабораторії Держпродспоживслужби **Коцюбинському Володимиру Григоровичу** за сприяння у проведенні дослідів на кролях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Safety and Immunogenicity of a Chimeric Subunit Vaccine against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Pregnant Cows / R.M. Vidal et al. International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24. no. 3. 2771 p. DOI:10.3390/IJMS24032771.
2. Головка А.М., Напненко О.О. Біологічна безпека та біозахист – основа протидії новим біологічним загрозам і викликам. Ветеринарна медицина. 2024. Вип. 110. С. 5–7. DOI:10.36016/VM-2024-110-1.
3. Бегас В.Л., Горбачова В.П. Аспекти правового регулювання принципу «Єдине здоров'я» в Україні: зб. матер. Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції «Єдине здоров'я»: реалії і перспективи». Житомир: ПНУ, 2024. С. 6–9.
4. Башенко М.І., Мандигра М.С., Стегній Б.Т., Герілович А.П. Актуальні проблеми біологічної безпеки в контексті реалізації стратегії МЕБ, ВООЗ, ФАО «Єдине здоров'я». Ветеринарна медицина. 2016. Вип. 102. С. 5–8.
5. Galaburda M., Yustyniuk V., Galat M., Jokelainen P. Jean Monnet Module “Integration of the EU One Health Framework and Policies in Ukraine” at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Life and Environmental Sciences of Ukraine: матер. міжнар. наук. конф. «Єдине здоров'я». 2022. С. 164–165.
6. Bacterial travellers' diarrhoea: A narrative review of literature published over the past 10 years / R. Lopez-Velez et al. Travel Med. and Infect. Disease. 2022. Vol. 47. P. 1–13. DOI:10.1016/j.tmaid.2022.102293.
7. Jenkins C. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Curr Top Microbiol Immunol. 2018. Vol. 416. P. 27–50. DOI:10.1007/82_2018_105.
8. Oral and Parenteral Vaccination against *Escherichia coli* in Piglets Results in Different Responses / G. Ramis et al. Animals. 2022. Vol. 12. No 20. 2758 p. DOI:10.3390/ani12202758.
9. Можливості імунофлуоресцентного методу в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб / О. Бойко та ін. Нотатки сучасної біології. 2021. № 1. Ч. 1. С. 93–102. DOI:10.29038/NCbio.21/1
10. РА і РНГА – як імунологічні методи контролю антигенності вакцин проти сальмонельозу птиці / О.П. Бойко та ін. Науковий вісник ЛНУ-ВМБ імені С.З. Гжицького. Ветеринарні науки, 2022. Т. 24. № 105. С. 102–108. DOI:10.32718/NVLVET10515.
11. Laramore C.R., Moritz C.W. Fluorescent antibody technique in detection of Salmonella in animal feed and feed ingredients. Appl. Microbiol. 1969. Vol. 17. No 3. P. 352–354. DOI:10.1128/am.17.3.352-354.1969.
12. Atamas V.A. Production of immunofluorescent lactoglobulin and its use for diagnosing calf paratyphoid. Prevention and Treatment of Diseases in Agricultural Animals in Southern Ukraine: Proceedings of the Odessa Agricultural Institute. 1968. No 2. P. 27–32.
13. Bulatova T.I., Ivanova L.G., Matveev K.I. Application of highly specific antitoxin sera for detection of *Clostridium botulinum* types F and B using the luminescent-serological method. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1971. No 9. P. 101–106.
14. Batty J., Walker P.D. Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies. J. Pathol. Bact. 1963. Vol. 85. No 2. P. 517–521.
15. Knox A., Zerna G., Beddoe T. Current and Future Advances in the Detection and Surveillance of Biosecurity-Relevant Equine Bacterial Diseases Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Animals. 2023. Vol. 13. No 16. 2663 p. DOI:10.3390/ani13162663.
16. Strategies and innovations for combatting diseases in animals (Review) / M. Ahmad et al. World Academy of Sciences Journal. 2024. Vol. 6. No 6. DOI:10.3892/wasj.2024.270.
17. Arshadi N., Mousavi S.L., Amani J., Avicenna N.S. Immunogenic Potency of Formalin and Heat Inactivated *E. coli* O157:H7 in Mouse Model Administered by Different Routes. J Med Biotechnol. 2020. Vol.12. No 3. P. 194–200.
18. A chimeric protein-based vaccine elicits a strong IgG antibody response and confers partial protection against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in mice / D.A. Montero et al. Front Immunol. 2023. Vol. 27. No 14. P. 1–17. DOI:10.3389/fimmu.2023.1186368.
19. Jarso H.A., Eskeziyaw M.B., Mengistu Y.D., Tessema S.T. Designing of immunodiagnostic assay using polyclonal antibodies for detection of Enteropathogenic *Escherichia coli* strains. PLOS ONE. 2024. Vol. 19. No 12. DOI:10.1371/journal.pone.0315848.
20. Chandler H.M. Rabbit immunoglobulin responses to the flagella, somatic and protective antigens of highly protective strain of *Clostridium chauvoei*. Infection and Immunity. 1975. Vol. 12. No 1. P. 143–147. DOI:10.1128/iai.12.1.143-147.1975.
21. Sharma V.K., Schaut R.G., Loving C.L. Vaccination with killed whole-cells of *Escherichia coli* O157:H7 hha mutant emulsified with an adjuvant induced vaccine strain-specific serum antibodies and reduced *E. coli* O157:H7 fecal shedding in

cattle. *Vet Microbiol.* 2018. Vol. 219. P. 190–199. DOI:10.1016/j.vetmic.2018.04.003.

22. Івченко В.М., Шарандак В.В., Горбатюк О.І., Абрамов А.В. Імунологічні методи досліджень в лабораторіях ветеринарної медицини. Біла Церква: БЦНАУ, 2006. 99 с.

23. Storz H. Geretetechnik-bedingte problem bei der Immunfluoreszenz-mikroskopie. *Ztschr. Ges. Inn. Med.* 1983. Vol. 38. P. 101–104.

24. Boyko P.K. Immunofluorescent identification of the causative agent of emphysematous carbuncle: author's abstract. dissertation ... candidate of veterinary sciences. 16.00.03. M: MBA, 1982. 24 p.

25. Optimizing the protection of cattle against *Escherichia coli* O157:H7 colonization through immunization with different combinations of H7flagellin, Tir, Intimin-531 or EspA / T.N. McNeilly et al. *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10. No 5. DOI:10.1371/journal.pone.0128391.

26. Berman J.W. Amplification of the biotin-avidinimmunofluorescence technique. *J. Immunol. Methods.* 1980. Vol. 36. No 3–4. P. 335–339. DOI:10.1016/0022-1759(80)90138-6.

27. Immune response of horses to inactivated African horse sickness vaccines / M. Rodríguez et al. *BMC Veterinary Research.* 2020. Vol. 16. No 1. DOI:10.1186/s12917-020-02540-y.

28. Evaluation of immunogenicity and dose dependent immune response against common bovine originated mastitogens in rabbit model / B.A. Shah et al. 2023. Vol. 33. No 3. DOI:10. 36899/japs.2023.3.0645.

REFERENCES

1. Vidal, R.M., Montero, D.A., Del Canto, F., Salazar, J.C., Arellano, C., Alvarez, A., Padola, N.L., Moscuza, H., Etcheverría, A., Fernández, D., Velez, V., García, M., Colello, R., Sanz, M., Oñate, A. (2023). Safety and Immunogenicity of a Chimeric Subunit Vaccine against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Pregnant Cows. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 24, no. 3, 2771 p. DOI:10.3390/IJMS24032771.

2. Holovko, A.M., Napnenko, O.O. (2024). Biologichna bezpeka ta biozakhyst – osnova protydyi novym biologichnym zahrozam i vyklykam [Biosafety and biosecurity are the basis for countering new biological threats and challenges]. *Veterynarna medytsyna [Veterinary medicine]*. Issue 110, pp. 5–7. DOI:10.36016/VM-2024-110-1. (in Ukrainian).

3. Behas, V.L., Horbachova, V.P. (2024). Aspekty pravovoho rehulyuvannya pryntsyphu «Yedynе zdorov'ya» v Ukrayini: Zbirnyk materialiv Vseukrayins'koyi naukovo-praktychnoyi internet-konferentsiyi «Yedynе zdorov'ya»: realiyyi i perspektyvy» [Aspects of legal regulation of the principle of “One Health” in Ukraine: collection of materials of the All-Ukrainian scientific and practical Internet conference “One Health”: realities and prospects”]. *Zhytomyr: PNU*, pp. 6–9. (in Ukrainian).

4. Bashchenko, M.I., Mandyhra, M.S., Stehniy, B.T., Herilovych, A.P. (2016). Aktual'ni prob-

lemy biologichnoyi bezpeky v konteksti realizatsiyi stratehiyi MEB, VOOZ, FAO «Yedynе zdorov'ya» [Current issues of biological safety in the context of the implementation of the OIE, WHO, FAO “One Health” strategy]. *Veterynarna medytsyna [Veterinary medicine]*, Issue 102, pp. 5–8. (in Ukrainian).

5. Galaburda, M., Yustyniuk, V., Galat, M., Jokelainen, P. (2022). Jean Monnet Module “Integration of the EU One Health Framework and Policies in Ukraine” at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Life and Environmental Sciences of Ukraine: proceedings of the International Scientific Conference “One Health”. pp. 164–165.

6. Lopez-Velez, R., Lebens, M., Bundy, L., Barriga, J., Steffen, R. (2022). Bacterial travellers' diarrhoea: A narrative review of literature published over the past 10 years. *Travel Med. and Infect. Disease*, Vol. 47, pp. 1–13. DOI:10.1016/j.tmaid.2022.102293.

7. Jenkins, C. (2018). Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* Vol. 416, pp. 27–50. DOI:10.1007/82_2018_105.

8. Ramis, G., Pérez-Esteruelas, L., Gómez-Cabrera, C., de Pascual-Monreal, C., Gonzalez-Guijarro, B., Párraga-Ros, E., Sánchez-Urbe, P., Claver-Mateos, M., Mendonça-Pascoal, L., Martínez-Alarcón, L. (2022). Oral and Parenteral Vaccination against *Escherichia coli* in Piglets Results in Different Responses. *Animals*. Vol. 12, no. 20, 2758 p. DOI:10.3390/ani12202758.

9. Boyko, O., Tytyuk, O., Panivs'ka, O., Poruchyns'kyi, B., Boyko, P. (2021). Mozhlyvosti imunofluorescentnoho metodu v laboratorniy diahnosytsi infektsiynykh khvorob [Possibilities of the immunofluorescence method in laboratory diagnostics of infectious diseases]. *Notatky suchasnoyi biolohiyi [Notes of modern biology]*. no. 1, Part 1, pp. 93–102. DOI:10.29038/NCbio.21/1. (in Ukrainian).

10. Boyko, O.P., Kurtyak, B.M., Sen', O.M., Romanovych, M.S., Sobko, H.V., Pundyak, T.O., Boyko, P.K. (2022). RA i RNHA – yak imunologichni metody kontrolyu antyhennosti vaktsyn proty sal'monel'ozu ptytsi [RA and RNGA – as immunological methods for controlling the antigenicity of vaccines against poultry salmonellosis]. *Naukovyy visnyk LNUVMB imeni S.Z. Gzhyts'koho [Scientific Bulletin of the S.Z. Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine]*. *Veterynarni nauky [Veterinary Sciences]*, Vol. 24, no. 105, pp. 102–108. DOI:10.32718/NVLVET10515. (in Ukrainian).

11. Laramore, C.R., Moritz, C.W. (1969). Fluorescent antibody technique in detection of *Salmonella* in animal feed and feed ingredients. *Appl. Microbiol.* Vol. 17, no. 3, pp. 352–354. DOI:10.1128/am.17.3.352-354.1969.

12. Atamas, V.A. (1968). Production of immunofluorescent lactoglobulin and its use for diagnosing calf paratyphoid. *Prevention and Treatment of Diseases in Agricultural Animals in Southern Ukraine: Proceedings of the Odessa Agricultural Institute*. no. 2, pp. 27–32.

13. Bulatova, T.I., Ivanova, L.G., Matveev, K.I. (1971). Application of highly specific antitoxin

sera for detection of *Clostridium botulinum* types F and B using the luminescent-serological method. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, no. 9, pp. 101–106.

14. Batty, J., Walker, P.D. (1963). Differentiation of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies. J. Pathol. Bact., Vol. 85, no. 2, pp. 517–521.

15. Knox, A., Zerna, G., Beddoe, T. (2023). Current and Future Advances in the Detection and Surveillance of Biosecurity-Relevant Equine Bacterial Diseases Using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Animals. Vol. 13, no. 16, 2663 p. DOI:10.3390/ani13162663.

16. Ahmad, M., Ahmed, I., Akhtar, T., Amir, M., Parveen, S., Narayan, E., Iqbal, H.M., Rehman, S. (2024). Strategies and innovations for combatting diseases in animals (Review). World Academy of Sciences Journal, Vol. 6, no. 6. DOI:10.3892/wasj.2024.270.

17. Arshadi, N., Mousavi, S.L., Amani, J., Avicenna, N.S. (2020). Immunogenic Potency of Formalin and Heat Inactivated *E. coli* O157:H7 in Mouse Model Administered by Different Routes. J Med Biotechnol., Vol. 12, no. 3, pp. 194–200.

18. Montero, D.A., Garcia-Betancourt, R., Vidal, R., Velasco, J., Palacios, P.A., Schneider, D., Vega, C., Gómez, L., Montecinos, H., Soto-Shara, R., Oñate, Á., Carreño, L.J. (2023). A chimeric protein-based vaccine elicits a strong IgG antibody response and confers partial protection against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in mice. Front Immunol. Vol. 27, no. 14, pp. 1–17. DOI:10.3389/fimmu.2023.1186368.

19. Jarso, H.A., Eskeziyaw, M.B., Mengistu, Y.D., Tessema, S.T. (2024). Designing of immunodiagnostic assay using polyclonal antibodies for detection of Enteropathogenic *Escherichia coli* strains. PLOS ONE, Vol. 19, no. 12. DOI:10.1371/journal.pone.0315848.

20. Chandler, H.M. (1975). Rabbit immunoglobulin responses to the flagella, somatic and protective antigens of highly protective strain of *Clostridium chauvoei*. Infection and Immunity. Vol. 12, no. 1, pp. 143–147. DOI:10.1128/iai.12.1.143-147.1975.

21. Sharma, V.K., Schaut, R.G., Loving, C.L. (2018). Vaccination with killed whole-cells of *Escherichia coli* O157:H7 hha mutant emulsified with an adjuvant induced vaccine strain-specific serum antibodies and reduced *E. coli* O157:H7 fecal shedding in cattle. Vet Microbiol., Vol. 219, pp. 190–199. DOI:10.1016/j.vetmic.2018.04.003.

22. Ivchenko, V.M., Sharandak, V.V., Horbatiuk, O.I., Abramov, A.V. (2006). Immunologichni metody doslidzhen' v laboratoriyakh veterynarnoyi medytsyny [Immunological research methods in veterinary medicine laboratories]. Bila Tserkva: BTSNAU, 99 p. (in Ukrainian).

23. Storz, H. (1983). Geretetechnik-bedingte problem bei der Immunfluoreszenz-mikroskopie. Ztschr. Ges. Inn. Med. Vol. 38, pp. 101–104.

24. Boyko, P.K. (1982). Immunofluorescent identification of the causative agent of emphysema-

tous carbuncle: author's abstract of the dissertation ... candidate of veterinary sciences 16.00.03. M.: MVA, 24 p.

25. McNeilly, T.N., Mitchell, M.C., Corbishley A., Nath, M., Simmonds, H., Mcteer, S.P., Mahajan, A., Low, J.C., Smith, D.G., Huntley, J.F., Gally, D.L. (2015). Optimizing the protection of cattle against *Escherichia coli* O157:H7 colonization through immunization with different combinations of H7 flagellin, Tir, Intimin-531 or EspA. PLoS ONE, Vol. 10, no. 5. DOI:10.1371/journal.pone.0128391.

26. Berman, J.W. (1980). Amplification of the biotin-avidin immunofluorescence technique. J. Immunol. Methods., Vol. 36, no. 3–4, pp. 335–339. DOI:10.1016/0022-1759(80) 90138-6.

27. Rodríguez, M., Joseph, S., Pfeffer, M., Raghavan, R., Wernery, U. (2020). Immune response of horses to inactivated African horse sickness vaccines. BMC Veterinary Research. Vol. 16, no. 1. DOI:10.1186/s12917-020-02540-y.

28. Shah, B.A., Avais, M., Khan, J.A., Rabhani, M., Anjum, A.A., Ali, M.A., Awais, M., Zaman, S.H., Mahmood, S., Ashraf, M., Ahmad, S. (2023). Evaluation of immunogenicity and dose dependent immune response against common bovine originated mastitogens in rabbit model. June, Vol. 33, no. 3. DOI:10.36899/japs.2023.3.0645.

Selection of donor animals for the production of immune diagnostic sera against escherichiosis

Poruchynskyi B., Boyko P.

The "One Health" strategy envisions the control of all processes in the food production chain "from farm to fork." The detection of biotoxins, including enterotoxigenic *Escherichia coli*, can be carried out by various methods. However, none of them can be classified as rapid methods. The fluorescent antibody technique (FAT), which combines the objectivity of microscopic methods with the high specificity of immunological reactions, may be applied in such a role.

Analysis of FAO reports shows that monitoring for the presence of enteropathogenic *E. coli* is a vital part of the "One Health" strategy. The development of rapid methods for the indication and identification of enterotoxigenic *E. coli* is a current topic of scientific investigation, and FAT is one of such method. The diagnostic effectiveness of FAT depends on the activity and specificity of *Escherichia coli* sera, which in turn depends on the donor animals, immunization schemes, and antigenicity of the vaccine preparations.

Objective of the Study is to perform a comparative assessment of two immunization schemes in different animal species using a vaccine preparation from inactivated *E. coli* microbial cells.

As the vaccine preparation, a 5-billion suspension of microbial cells from a 24-hour culture of an enterotoxigenic β -hemolytic strain of *E. coli* grown in tryptone-soy yeast broth was used. The cells were inactivated with formaldehyde (0.4% of culture volume) and concentrated with Aerosil A-300 (3 mg/ml).

Rabbits, sheep, bulls, and horses (6 animals of each species) were used as donor animals. They were selected based on similarity in age, body weight, housing, and feeding conditions. All animals were clinically healthy.

Two immunization schemes were used. In the first scheme, the vaccine was administered subcutaneously three times, and in the second – four times, at 4-day intervals in twofold increasing doses. Blood samples for testing were collected on the 21st day after the last vaccine administration.

Agglutinin levels were determined using the agglutination reaction (AR). A 2-billion suspension of inactivated *E. coli* cells was used as the antigen. The reaction was performed in a volume of 1 cm³. The titer was defined as the last dilution of serum that showed agglutination of at least 2 pluses.

The highest agglutinin titers were found in rabbit sera – 1:7253±1389 (first immunization scheme) and 1:9387±853 (second scheme). Slightly lower antibody titers were found in sheep – 1:5547±1028 (first scheme) and 1:8533±1079 (second scheme), and horses – 1:5973±1428 and 1:6827±1079 respectively. The lowest titers were found in bull sera – 1:4267±540 (first scheme) and 1:4693±427 (second

scheme). This indicates that different animal species react differently to the same antigen.

It was established that the difference in agglutinin levels between the second and first immunization schemes was 35% in sheep, 22.8% in rabbits, 12.5% in horses, and 9.1% in cattle. Thus, the fourth administration of the vaccine enhances the humoral response in immunized animals. However, it also causes stress and sensitization in the animals. Therefore, three administrations of the vaccine are sufficient for producing active *Escherichia coli* sera.

During immunization with *Escherichia coli* antigen, the highest agglutinin titers were recorded in the sera of rabbits (1:9387±853) and sheep (1:8533±1079), slightly lower in horses (1:6827±1079), and the lowest in bulls (1:4693±427). The immunization scheme involving three parenteral administrations of the vaccine at 4-day intervals in twofold increasing doses stimulates a high level of agglutinins without causing stress, and therefore can be used for obtaining highly active escherichiosis diagnostic sera.

Key words: enterotoxigenic *Escherichia coli*, immunization schemes, vaccine preparations, donor animals, agglutination reaction, bacterial antigens.



Copyright: Поручинський Б.А., Бойко П.К. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

