



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **57414** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
G01N 21/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЕНТЕРОТОКСИНІВ ESCHERICHIA COLI КЛІТИННИМ БІОСЕНСОРОМ НА ОСНОВІ ІНФУЗОРІЙ STYLONICHIA MYTILUS

1

(21) u201009869

(22) 09.08.2010

(24) 25.02.2011

(46) 25.02.2011, Бюл. № 4, 2011 р.

(72) СУХАРЄВ ЮРІЙ СТАНІСЛАВОВИЧ, СУХАРЄВ
СТАНІСЛАВ ЮРІЙОВИЧ, ГОЛОВІНА ІРИНА ВО-
ЛОДИМИРІВНА

(73) СУХАРЄВ ЮРІЙ СТАНІСЛАВОВИЧ, СУХАРЄВ
СТАНІСЛАВ ЮРІЙОВИЧ, ГОЛОВІНА ІРИНА ВО-
ЛОДИМИРІВНА

2

(57) Спосіб біосенсорного визначення ентеротоксинів *Escherichia coli*, що включає приготування суміші розчину з ентеротоксинами і інфузоріями, інкубацію, забарвлення трипановим синім, який **відрізняється** тим, що використовують біотранс-д'юсер на основі інфузорій *Stylonichia mytilus*, який розпізнає та перетворює інформацію про кількість інфузорій в сигнал, що фіксується фізичним транс-д'юсером, який здійснює підрахунок загинув під впливом ентеротоксинів інфузорій, а також оцінку ступеня токсичності в автоматичному режимі.

Корисна модель відноситься до біотехнології, а саме до способу визначення ентеротоксинів *Escherichia coli* при діагностиці колібактеріозу, а також для оцінки токсичності природних вод, промислових викидів, кормів і других об'єктів навколишнього середовища.

За даними світової літератури, провідним елементом оцінки патогенності є наявність у *E. coli* генів, детермінуючих синтез ентеротоксинів - термостабільного (ST) і термолабільного (LT), з дією яких і пов'язаний розвиток діарейного синдрому [Wingate D., Guidelines for adults on self-medication for the treatment of acute diarrhea / D. Wingate, S.E. Phillips, S.J. Lewis // Aliment. Pharmacol Ther. - 2001. - 15. - P.773-782; Feng P., Diarrheagenic *Escherichia coli* / P. Feng, S.D. Weagant // Bacteriological Analytical Manual September 2002. - 8 th Edition].

В зв'язку з чим, при експрес-діагностиці колібактеріозу необхідна ідентифікація цих факторів патогенності. Але це пов'язано зі значними труднощами головним чином з недосконалістю сучасних методів визначення токсигенності *E. coli*.

Недоліком існуючих способів є їх трудомісткість, дорожкоштовність, важковідтворюваність, використання дефіцитних реагентів, а також невідповідність нормам етики по відношенню до тварин.

Існує спосіб визначення ентеротоксинів *E. coli* за допомогою інфузорій *Stylonichia mytilus*, в якому

ентеротоксини додані до культури інфузорій викликають їх лізис [Шпонько Ю.Б. Патент "Способ биотестирования токсигенности кишечной палочки" РФ №2262529 от 20 октября 2005 года.]. За цим способом середовище з інфузоріями змішують на предметном склі з супернатантом культур токсигенних штамів *E. coli* у співвідношенні 3:1, скло з досліджуваним матеріалом містять у чашки Петрі, і ставлять в термостат з температурою 24-26°C, через 60хв. за допомогою бінакулярного мікроскопа (збільшення 2×8) проводять підрахунок числа живих інфузорій, який порівнюють з початковим значенням, загинувлі вважають тільки лізованні особини. Цей спосіб може бути прототипом.

Недоліком способу є трудомісткість, важковідтворюваність і суб'єктивізм пов'язаний з візуальною оцінкою результатів аналізу.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення ентеротоксинів *E. coli* за допомогою клітинного біосенсора, що включає приготування суміші розчину ентеротоксинів з біотранс-д'юсером на основі інфузорій *Stylonichia mytilus*, виконуючого функцію розпізнавання токсинів, інкубацію, додавання барвника, і здійснення підрахунку загинувлі під дією токсинів інфузорій, а також оцінку ступеня токсичності фізичний транс-д'юсером в автоматичному режимі.

Основними перевагами розробленого способу є те, що інфузорії - доступний біологічний матері-

(13) **U**
(11) **57414**
(19) **UA**

ал, який культивується, легко відтворюється і підтримується у чистій культурі; автоматизація обліку і аналізу одержаних даних, що виключає фактор суб'єктивності при візуальній оцінці результатів досліджень; специфічність - здатність аналізувати складні суміші на присутність ентеротоксинів *E.coli* без передчасної їх очистки; можливість відносного визначення кількості і строків максимального накопичення ентеротоксинів у середовищі культивування, чутливість, здатність до виявлення низьких концентрацій ентеротоксинів у малих зразках; швидка відповідь; безпека при використанні; точність результатів; доступність для масового виробництва, а також можливість здійснювати оцінку токсичності природних вод, промислових викидів, кормів і внутрішнього середовища організму людини і тварин, що відповідає критерію "новизна".

Спосіб виконується таким чином.

В ячейки 96 луночного полістиролового планшета вносять по три краплі тест-організмів, при цьому в лунку попадає приблизно 50 інфузорій *Stylonichia mytilus*; для тестування однієї проби використовують дві повторності, при цьому 2 лунки залишаються контрольними; в якості контролю використовують стерильне середовище Лозіна-Лозинського з 0,5-1,0% розчину тріпанового синього, в якому інфузорії залишаються живими.

Досліджуваний водний розчин тестуємих речовин вносять піпеткою в лунки планшета в кількості 4 крапель, не торкаючись поверхні середовища з внесеними раніше інфузоріями, після чого додають 0,5-1,0% розчин тріпанового синього.

Через 60хв. після внесення проби, результат токсикологічного аналізу фіксують цифровою фотокамерою, встановленою на мікроскоп, і переносять на екран монітора, де за допомогою програми "Totallab" здійснюють підрахунок чисельності загинувших (забарвлених) інфузорій.

Приклад 1.

Добові культури токсигенних штамів *E.coli* центрифугували на рефрижераторній центрифугі при 5000g на протязі 30хв., відокремлювали бакмасу і одержували безклітинний супернатант, який містив нативні ентеротоксини.

Визначення білка ентеротоксинів проводили спектрофотометрично за методом Варбурга і Христіана при 260 і 280нм. Концентрацію білка розраховували по формулі Калькара: мг/мл = $1,45E_{280} - 0,74E_{260}$.

У якості контролю використовували штам *E.coli* M-17, представляючий собою пробіотичний препарат "Колібактерин" ("Ромакол").

Для визначення специфічності біотрансд'юсера - стерильне живильне середовище Хоттінгера, а також культуральний безклітинний фільтрат *Proteus vulgaris*.

Культивування інфузорій проводили в закритих чашках Петрі у середовищі Лозіна-Лозинського, яке готували на дистильованій воді з додаванням наступних солей (г/л): NaCl - 0,1; KCl - 0,01; NaHCO₃ - 0,02; MgSO₄ - 0,01; CaCl₂ - 0,01, підтримуючи оптимальну температуру 24-26°C.

Досліджуваний водний розчин тестуємих речовин вносили піпеткою в лунки планшета в кількості 4 крапель, не чіпаючи поверхні середовища з

внесеними раніше інфузоріями, після чого додавали 1% розчин тріпанового синього.

Оптична підсистема забезпечувала надійну видимість об'єкту розміром 200-250мкм (інфузорії *Stylonichia mytilus*) і захват у поле зору фотокамери всієї лунки мікропанелі діаметром 14мм і глибиною 6мм.

Електронна підсистема забезпечувала: зручну настройку системи; визначення ступеня токсичності одного або декількох зразків у заданому числі лунк; введення і редагування необхідної додаткової інформації; запис одержаних результатів на диск і читання їх з диска; розпечатку одержаних результатів на принтері.

Через 60хв. після внесення проби, результат токсикологічного аналізу фіксували цифровою фотокамерою і переносили зображення на екран монітора, де за допомогою програми "Totallab" здійснювали підрахунок чисельності загинувших інфузорій. Фіксували тільки забарвлені особини.

Чисельність інфузорій через 60хв. експозиції у % від числа посажених розраховували по формулі:

$$N = \frac{N_2}{N_1} \times 100\%,$$

де: N₁ - загальна чисельність посажених інфузорій;

N₂ - загальна чисельність інфузорій через 60хв. експозиції.

Ступень токсичності культуральних безклітинних супернатантів штамів *E.coli*, визначали за допомогою біотрансд'юсера, по кількості загинувших інфузорій *Stylonichia mytilus*, відповідно зі шкалою, вказаною в табл. 1.

Для одержання достовірних даних дослід багаторазово повторювали, потім підраховували середній показник. Чим вище відсоток лізованих (загинувших) інфузорій, тим більш токсичним є культуральний супернатант, а досліджуваний штам *E.coli* відповідно - токсигенним (табл. 2).

Приклад 2.

Вимоги до умов аналізу і параметрам програми:

- температура в лунці в момент вимірювання повинна підтримуватися на рівні 24-26°C;

- час експозиції інфузорій в лунці після їх пересадки з чашки Петрі перед першим підрахунком складає не менше 15хв. і залежить від встановлення оптимальної температури і чистоти лунки.

- для роботи використовували тільки добову культуру інфузорій. Культура більш старшого віку (2-3 добова) характеризується нестабільною реакцією на токсичні речовини і більш високою стійкістю до них;

- для створення оптимальних оптичних умов слід забезпечити вибір такого об'єму розчину, щоб його рівень у лунці не перевищував 4мм, що досягалось при внесенні у лунку 6-7 крапель розчину;

- оптимальна щільність інфузорій - в межах 50-70 клітин у лунці;

- особливо суворі вимоги пред'являли до чистоти лунки, критерієм якої є відсутність в контролі подавлення активності інфузорій через 60хв. після першого підрахунку (перший підрахунок проводили через 20-30хв. після посадки інфузорій у лунку).

Приклад 3.

Визначення відносної кількості і строків максимального накопичення LT- і ST-ентеротоксинів *E.coli*. Токсигенні штами кишкової палички культивували в Синтетичному живильному середовищі [Сухарев Ю.С., 1992] при 37°C, і через 18, 20 і 24 години здійснювали контроль токсичності, визначаючи кількість загиблих *Stylonichia mytilus* у середовищі культивування. У якості контролю викорис-

товували не токсигенний штам, який вирощували в таких самих умовах, стерильне середовище культивування токсигенних штамів і культуральний безклітинний супернатант *P.vulgaris*. Максимальне накопичення токсинів реєстрували через 24 години культивування штамів, слідством чого був більш високий відсоток загибелі інфузорій в супернатантах культур *E.coli* (табл. 3).

Таблиця 1.

Ступень токсичності культуральних безклітинних супернатантів ентеротоксигенних штамів *E.coli*, визначаєма по кількості загиблих інфузорій *Stylonichia mytilus*.

Ступень токсичності	Загибло інфузорій (%)
Нетоксичний	0-19
Слаботоксичний	20-50
Токсичний	51-100

Таблиця 2.

Кількість загиблих *Stylonichia mytilus* в безклітинних супернатантах штамів *E.coli*, які вирощували у живильному середовищі Хоттінгера (24 год., 37°C). В контролі використовували стерильне середовище Хоттінгера і культуральний безклітинний супернатант *P.vulgaris*.

Досліджуваний зразок	Експозиція (хвилин)	Загиблих <i>Stylonichia mytilus</i> (%) X±s, n=4
Супернатант <i>E.coli</i> O9ST ⁺	60	97,5±2,5
Супернатант <i>E.coli</i> O26LT ⁺	60	98,0±1,5
Супернатант <i>E.coli</i> M17	60	2,5±0,2
Супернатант <i>P.vulgaris</i>	60	2,0±0,2
Стерильне середовище Хоттінгера	60	2,0±0,2

Таблиця 3.

Відносна кількість і строки максимального накопичення LT- и ST-ентеротоксинів *E.coli*, визначені за допомогою клітинного біосенсора на основі інфузорій *Stylonichia mytilus*.

Досліджуваний зразок	Час культивування штамів (год)	Загиблих <i>Stylonichia mytilus</i> (%) X±s, n=4
Супернатант <i>E.coli</i> O9ST ⁺	18	55,0±2,3
	20	60,0±2,5
	24	97,5±2,5
Супернатант <i>E.coli</i> O26LT ⁺	18	59,5±1,5
	20	63,5±1,5
	24	98,0±1,5
Супернатант <i>E.coli</i> M17	18	2,0±0,2
	20	2,5±0,2
	24	2,5±0,2
Супернатант <i>P.vulgaris</i>	-	2,0±0,2
Стерильне середовище Хоттінгера	-	2,0±0,2