



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **58052** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 21/17 (2006.01)**  
**G01N 33/50 (2006.01)**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ІМУНОБІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI*

1

(21) u2010111253

(22) 20.09.2010

(24) 25.03.2011

(46) 25.03.2011, Бюл.№ 6, 2011 р.

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

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

(57) Спосіб кількісного визначення ентеротоксинів  
*E. coli* за допомогою імунобіосенсора, що включає  
приготування суміші досліджуваного розчину з

2

ентеротоксинами і біотрансд'юсером, який **відрізняється** тим, що використовують біотрансд'юсер на основі часток монодисперсних полістиролових латексів з діаметром 0,31 мкм, іммобілізованих біспецифічними антитілами до кон'югату ентеротоксинів, який розпізнає аналізовані молекули, а за допомогою фотоелектричного нефелометра, який використовують як фізичний трансд'юсер, перетворюють і реєструють інформацію про міру каламутності розчину по інтенсивності світлового потоку розсіяного завислими частками латексів, що аглютинують під дією ентеротоксинів.

Корисна модель належить до біотехнології, а саме до способу імунобіосенсорного визначення ентеротоксинів *E.coli* при діагностиці колібактеріозу, а також для проведення епізоотологічного моніторингу за присутністю і розповсюдженням токсигенних *E.coli* в навколишньому середовищі.

За даними світової літератури, провідним елементом оцінки патогенності *E.coli* є наявність у неї генів, детермінуючих синтез ентеротоксинів - термостабільного (ST) і термолабільного (LT), з дією яких і пов'язаний розвиток діарейного синдрому у людей і сільськогосподарських тварин [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.-8th 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 способів є їх трудомісткість, дорожкозатратність, важковідтворюваність, використання дефіцитних реагентів, а також невідповідність нормам етики по відношенню до тварин.

Існує спосіб визначення ентеротоксинів *E.coli* за допомогою латексного діагностикума, в якому

частки монодисперсних полістиролових латексів, іммобілізовані специфічними імуноглобулінами антитоксичної сироватки крові, аглютинуються при наявності у досліджуваному матеріалі гомологічних токсичних речовин [Пат. А61К 39/108 Україна. Спосіб біотестування штамів *Escherichia coli*, продукуючих термостабільний (ST) ентеротоксин /Сухарев Ю. С.- №22298; заявлено 02. 10. 2006; опубл. 25. 04. 2007.-бюл. №5].

За цим способом на знежирене предметне скло наносять та змішують 1 краплю досліджуваної рідини і 1 краплю латексного діагностикума, облік реакції проводять візуально протягом 3 хвилин по 4-бальній системі: ++++ - чітка аглютинація у прозорій рідині; +++ - дрібні скупчення часток у прозорій рідині; ++ - дрібні скупчення часток у мутній рідині; + - ледве помітні частки у мутній рідині; - аглютинація відсутня, рідина рівномірно мутна, за позитивну реакцію вважають аглютинацію не менше ніж на ++, при негативному контролі, в контролі використовують латекси іммобілізовані імуноглобулінами нормальної сироватки крові. Цей спосіб може бути прототипом.

Недоліком способу є трудомісткість, суб'єктивізм пов'язаний з візуальною оцінкою результатів аналізу, а також неможливість кількісного визначення ентеротоксинів *E.coli*.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб кількісного визначення ентеротоксинів *E.coli* за допомогою імунобіосенсора, що

(19) **UA** (11) **58052** (13) **U**

включає використання біотрансд'юсера на основі часток монодисперсних полістиролових латексів з діаметром 0,31 мкм, іммобілізованих біспецифічними антитілами до кон'югату ентеротоксинів [Пат. А61К 39/108 Україна. Спосіб виготовлення гіперімунної антитоксичної сироватки крові до кон'югату термостабільного і термолабільного ентеротоксинів *E.coli* /Сухарев Ю. С.-№30128; заявлено 06.11.2007; опубл. 11. 02. 2008.-бюл. №3], який розпізнає аналізовані молекули токсинів, а фізичний трансд'юсер- перетворює і реєструє інформацію про міру каламутності розчину по інтенсивності світлового потоку розсіяного завислими частками латексів, що аглютинують під дією ентеротоксинів, за допомогою фотоелектричного нефелометра.

Використання способу визначення ентеротоксинів за допомогою імунобіосенсора дає змогу аналізувати складні суміші на присутність ентеротоксинів *E.coli*, без передчасної їх очистки; виявляти дуже низькі концентрації ентеротоксинів у малих зразках; здійснювати експрес-діагностику колібактеріозу, що дозволяє своєчасно проводити протиепідеміологічні і профілактичні заходи, а також здійснювати епізоотологічний моніторинг за присутністю і розповсюдженням токсигенних штамів кишкової палички у навколишньому середовищі, що відповідає критерію "новизна".

Спосіб виконується таким чином.

Біспецифічні антитіла до кон'югату ентеротоксинів *E.coli*, вилучені за допомогою імуносорбенту з гіперімунних антитоксичних сироваток крові або молозива, розводять в гліциновому буфері до одержання 1,0-1,2% концентрації, а частки монодисперсних полістиролових латексів з діаметром 0,31 мкм - у співвідношенні 1:3 гліциновим буфером, рН-8,0-8,2, потім змішують рівні об'єми розчинів латексів і антитоксинів, суміш витримують протягом 1-2 годин при 37°C періодично струшуючи, після чого додають дві частини гліцинового буфера, який містить 0,5-1,0 % гліцерину і витримують у холодильнику 3-5 днів при 4 °C; змішують рівні об'єми досліджуємої рідини і латексного біотрансд'юсера; за допомогою нефелометра, який використовують у ролі фізичного трансд'юсера, реєструють інформацію про вміст ентеротоксинів, по інтенсивності світлового потоку розсіяного завислими частками іммобілізованих антитілами латексів, що аглютинують під дією ентеротоксинів; у контролі використовують біотрансд'юсер виготовлений з латексів іммобілізованих імуноглобулінами нормальної кролячої сироватки крові, які не реагують з ентеротоксинами; різниця у показниках розсіювання світла між дослідними і контрольними зразками свідчить про наявність в досліджуваних пробах ентеротоксинів *E.coli*.

Приклад 1. Як досліджуваний матеріал для визначення ентеротоксинів, використовували фекалії хворих на діарею і вміст тонкого відділу кишечника

полеглих тварин. Кишковий вміст і фекалії центрифугували при 4000-6000g протягом 20-40 хвилин, збирали супернатант і концентрували його у 5 разів ПЕГ з молекулярною масою 35000-40000 D. Змішували рівні об'єми досліджуємої рідини і латексного біотрансд'юсера. При наявності у реакційній суміші гомологічних токсичних речовин наступала аглютинація часток латексів. В контролі використовували біотрансд'юсер, виготовлений з латексів іммобілізованих імуноглобулінами нормальної кролячої сироватки крові, які не реагували з ентеротоксинами *E.coli*. Різниця у показниках розсіювання світла між дослідними і контрольними зразками, що реєструвалася нефелометром 2100N (HACH), свідчила про наявність ентеротоксинів *E.coli*, (табл.1.).

Приклад 2. Для кількісного визначення ентеротоксинів в досліджуємих зразках готували серію стандартних розведень ST-ентеротоксина *E.coli* і будували калібровочну криву залежності величини розсіювання світла від середньої концентрації ентеротоксинів (n=4). В системі координат у вибраному масштабі по осі ординат відкладали одержані значення одиниць розсіювання світла, а по осі абсцис-відповідні значення концентрації ентеротоксина, (фіг. 1.).

Приклад 3. Специфічність латексного імунобіосенсора, т.т. здатність визначати тільки ту речовину, для визначення якої він розроблений, була підтверджена шляхом постановки тесту з безклітинним супернатантом *Proteus vulgaris* і стерильним середовищем культивування токсигенних штамів *E.coli*. Змішували рівні об'єми досліджуємої рідини і латексного біотрансд'юсера і визначали показники розсіювання світла нефелометром 2100N (HACH). Величина розсіювання світла безклітинного супернатанта *P.vulgaris*-1,0±0,85 NTU і стерильного середовища культивування токсигенних штамів - 6,5±0,91 NTU достовірно не відрізнялася від контролю - 5,0±0,91 NTU, (P≥0,1), (табл.2.).

Основними перевагами латексного імунобіосенсора є: автоматизація обліку і аналізу одержаних даних, що виключає фактор суб'єктивності при візуальній оцінці результатів досліджень; специфічність-здатність аналізувати складні суміші на присутність ентеротоксинів без передчасної їх очистки; чутливість, здатність кількісно визначати дуже низькі концентрації ентеротоксинів у малих зразках; швидка відповідь; безпека при використанні; точність результатів; доступність для масового виробництва, можливість здійснювати експрес-діагностику колібактеріозу, що дозволяє своєчасно проводити протиепідеміологічні і профілактичні заходи, а також здійснювати епізоотологічний моніторинг за присутністю і розповсюдженням токсигенних штамів кишкової палички у навколишньому середовищі.

Таблиця 1

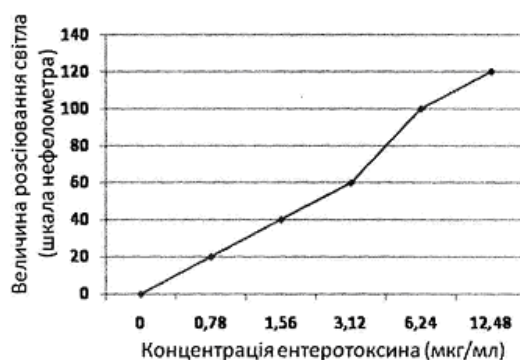
Концентрація ентеротоксинів *E.coli* в фекаліях хворих і вмісті тонкого відділу кишечника полеглих телят, визначаєма імунобіосенсором.

Досліджуваний зразок	Величина розсіювання світла (шкала нефелометра)	Концентрація ентеротоксина (мкг/мл)	$P_{д-к}$
Фекалії	75,0	$3,12 \pm 0,74$	$\leq 0,1$
Вміст кишечника	100,0	$6,24 \pm 0,85$	$\leq 0,1$
Контроль	5,0	-	-

Таблиця 2

Величина розсіювання світла (NTU) безклітинного супернатанту *P.vulgaris*, стерильного середовища культивування токсигенних штамів *E.coli* і контролю, визначаєма за допомогою нефелометра.

Досліджуєма речовина	Величина розсіювання світла (NTU) $\bar{X} \pm s$ , $n=4$	$P_{д-к}$
Безклітинний супернатант <i>P.vulgaris</i>	$7,0 \pm 0,85$	$\geq 0,1$
Стерильне середовище культивування <i>E.coli</i>	$6,5 \pm 0,91$	$\geq 0,1$
Контроль	$5,0 \pm 0,91$	-
NTU-нефелометричні одиниці каламутності.		



Фіг.1