



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56837 (13) U
(51) МПК

G01N 33/569 (2011.01)

G01N 21/27 (2011.01)

A61K 39/108 (2011.01)

C12N 15/31 (2011.01)

C12R 1/19 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНТЕРОТОКСИНІВ E.COLI

1

2

(21) u201009267

(22) 23.07.2010

(24) 25.01.2011

(46) 25.01.2011, Бюл.№ 2, 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 біосенсорного визначення ентеротоксинів E.coli, що включає приготування суміші розчину з ентеротоксинами і плазмою крові, інкубацію, додавання розчину АДФ, який **відрізняється** тим, що використовують біотрансд'юсер на основі тромбоцитів крові, який під дією ентеротоксинів E.coli розпізнає та перетворює інформацію про зміни агрегаційної активності тромбоцитів в сигнал, що фіксується фізичним трансд'юсером за допомогою фотометричного агрегометра.

Корисна модель відноситься до біотехнології, а саме до способу біосенсорного 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 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. - 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 не відповідність нормам етики по відношенню до тварин.

Існує спосіб визначення ентеротоксинів E.coli за допомогою тромбоцитів, в якому ентеротоксини додані до стабілізованої крові кролика індукують їх дезагрегацію (Фіг.1) [Головко А.Н., Ушкалов В.А., Сухарев Ю.С., Методические рекомендации по получению, очистке энтеротоксинов эшерихий и изготовлению антитоксических сывороток. - Харьков. - 1993. - 22 с.]. За цим способом до стабілізованої крові додають досліджуваний матеріал, інкубують 30 хв., за кімнатної температури, додають розчин АДФ (адиозин дифосфат), витримують за кімнатної температури 20 хв., пробу переносять в шприц, вертикально встановлений в штатив і залишають на одну годину. Після чого порцію освітленої плазми відбирають шприцем із зігнутою голкою і вносять в камеру Горяева. Підрахунок ведуть у п'яти великих квадратах камери, одержане число одиничних тромбоцитів множать на 50; 100% дезагрегація тромбоцитів є достовірним показником наявності в досліджуваному матеріалі ентеротоксинів E.coli. Тривалість реакції складає більше 3 год. Цей спосіб може бути прототипом.

Недоліком способу є трудомісткість, суб'єктивність пов'язана з візуальною оцінкою результатів аналізу, а також тривалість реакції, що не дає можливості встановити діагноз захворювання.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб біосенсорного визначення енте-

(19) UA (11) 56837 (13) U

ротоксинів *E.coli*, що включає приготування суміші розчину з ентеротоксинами і плазмою крові, інкубацію, додавання розчину АДФ шляхом вилучення попередньої очистки ентеротоксинів, використання біотрансд'юсера на основі тромбоцитів крові, який під дією ентеротоксинів *E.coli* розпізнає та перетворює інформацію про зміни агрегаційної активності тромбоцитів у сигнал, що фіксується фізичним трансд'юсером за допомогою фотометричного агрегометра.

Використання способу біосенсорного визначення дає змогу аналізувати складні суміші на присутність ентеротоксинів без попередньої їх очистки; виявляти дуже низькі концентрації ентеротоксинів у малих зразках; здійснювати експрес-діагностику колібактеріозу, визначати ентеротоксини *E.coli* ще до клінічної прояви хвороби, 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.

Кров для постановки реакції беруть у пробірку з антикоагулянтом у співвідношенні 1:9, і відстоюють протягом 60 хв. за температури 4°C, після чого відокремлюють плазму, яка містить $270 \cdot 10^3$ /мл тромбоцитів, у стерильну пробірку.

До 1 мл освітленої плазми додають 0,1-0,3 мл $3 \cdot 10^6$ М розчину АДФ, який є індуктором агрегації тромбоцитів, в концентрації 20-30 мкг/мл, потім додають розчин термолабільного, або (і) термостабільного ентеротоксинів *E.coli*, та інкубують 20-40 хв., періодично перемішуючи, витримують за кімнатної температури протягом 10-30 хв., після чого пробу переносять в агрегометр, який виступає в ролі фізичного трансд'юсера (перетворювача). На самописці отримують графічні зображення реакції тромбоцитів, що є біологічним трансд'юсером (перетворювачем).

Постановці реакції передували два контролю. Негативний контроль: до 1 мл плазми крові додають 0,1-0,3 мл антикоагулянта (14 % розчин сульфату магнія; 3,2 % розчин дегідрогідрату натрію або 5000 Од/мл гепарину) і 0,1-0,3 мл 0,85 % NaCl. Позитивний контроль: до 1 мл плазми крові додають 0,1-0,3 мл антикоагулянта і 0,1-0,3 мл розчину АДФ.

Кількість вільних тромбоцитів у позитивному контролі приймають за 100%. Дезагрегація тромбоцитів при негативному контролі є достовірним показником наявності у досліджуваному матеріалі ентеротоксинів *E.coli*.

Приклад 1

Штами *Escherichia coli* O26 (LT⁺) і O9 (ST⁺) - які продукують термолабільний і термостабільний ентеротоксини, окремо дворазово пасажували у

бульоні Хоттінгера, потім висівали в 500 мл флакони з розрахунку 2 мл культури на 100 мл середовища. Кількість середовища складала 1/2 об'єму ємності. Інкубували протягом 20-24 годин в умовах аерації та перемішування за температури 37°C.

Добові культури токсигенних штамів *E.coli* центрифугували на рефрижераторній центрифугі при 5000 g протягом 30 хв., відокремлювали бакмасу і одержували бесклітинний супернатант, що містив нативні ентеротоксини, які аналізували без попередньої очистки.

Визначення білка ентеротоксинів проводили спектрофотометрично за методом Варбурга і Христіана при 260 и 280 нм. Концентрацію білка розраховували за формулою Калькара: $mg/ml = 1,45E_{280} - 0,74E_{260}$.

До 1 мл освітленої плазми додавали 0,2 мл $3 \cdot 10^5$ М розчину АДФ, який є індуктором агрегації тромбоцитів, у концентрації 25 мкг/мл, витримували за кімнатної температури протягом 20 хв., потім додавали 0,5 мл розчину термолабільного, або (і) термостабільного ентеротоксинів *E.coli*, з вмістом білка в препаратах 10-20 мкг/мл. Більш високі концентрації зменшували, дезагрегуючи властивості ентеротоксинів, і інкубували 30 хв., періодично перемішуючи. Після чого реєстрували дезагрегацію тромбоцитів фотометричним методом у агрегометрі з графічним записом на самописці (мал. 2).

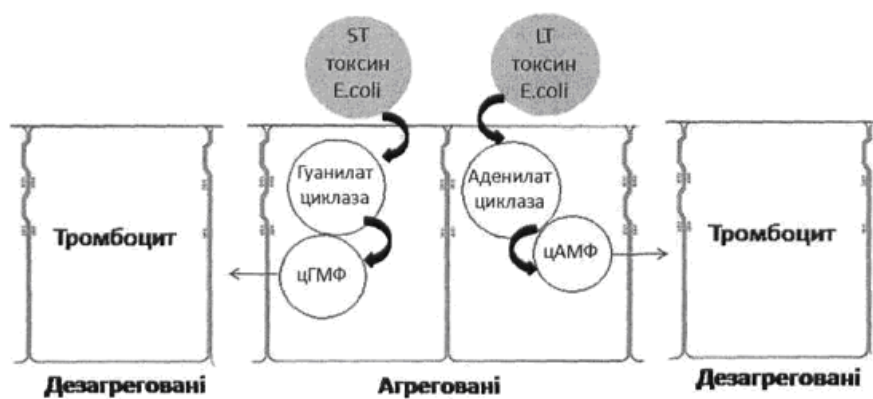
Негативний контроль: до 1 мл плазми крові додавали 0,2 мл 14 % розчину $MgSO_4$ і 0,2 мл 0,85 % NaCl, (мал. 3).

Позитивний контроль: до 1 мл плазми крові додавали 0,2 мл 14 % розчину $MgSO_4$ і 0,2 мл розчину АДФ, (мал. 4).

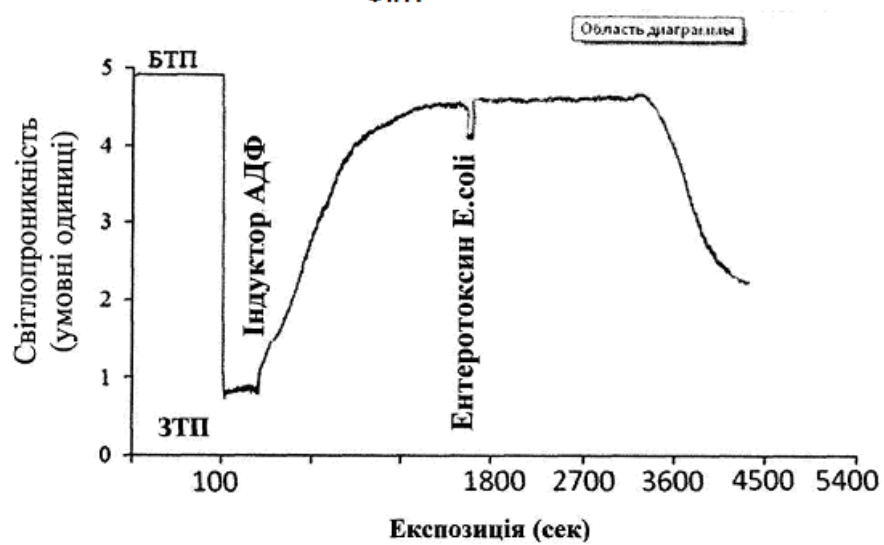
Приклад 2

Визначення специфічності тромбоцитарного біосенсора. До 1 мл освітленої плазми додавали 0,2 мл $3 \cdot 10^6$ М розчину АДФ у концентрації 25 мкг/мл, витримували за кімнатної температури протягом 20 хв., потім додавали 0,5 мл розчину мікотоксину *Fusarium graminearum* у концентрації 10-20 мкг/мл та інкубували 30 хв., періодично перемішуючи, після чого реєстрували агрегацію тромбоцитів фотометричним методом у агрегометрі з графічним записом на самописці (мал. 5).

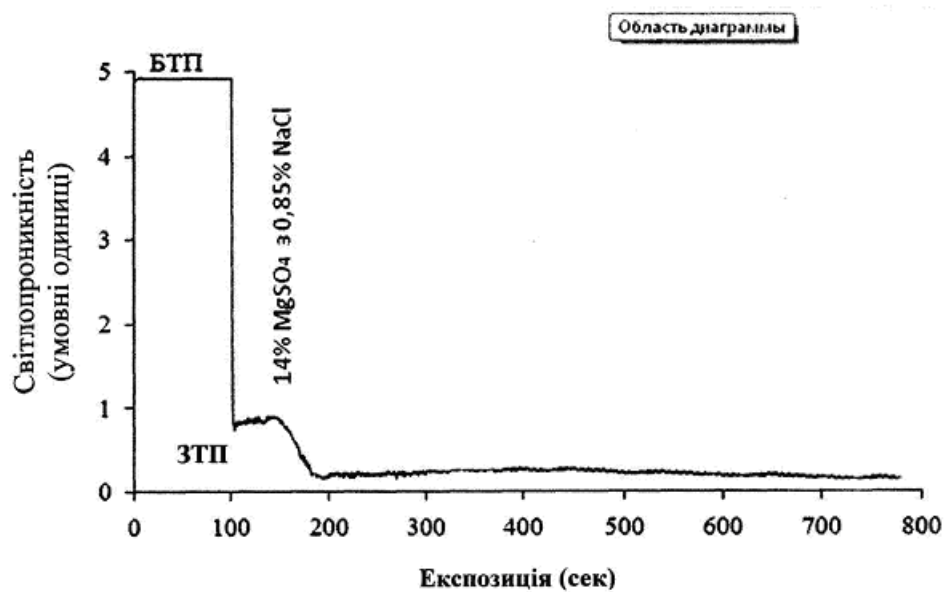
Таким чином, спосіб біосенсорного визначення ентеротоксинів *E.coli* дає змогу аналізувати складні суміші на присутність ентеротоксинів без передчасної їх очистки; виявляти дуже низькі концентрації ентеротоксинів у малих зразках; можливість здійснювати експрес-діагностику колібактеріозу, визначати ентеротоксини *E.coli* ще до клінічної прояви хвороби, що дозволяє своєчасно проводити протиепідеміологічні і профілактичні заходи, а також здійснювати епізоотологічний моніторинг за присутністю і розповсюдженням токсигенних штамів кишкової палички у навколишньому середовищі.



Фіг.1



Фіг.2



Фіг.3

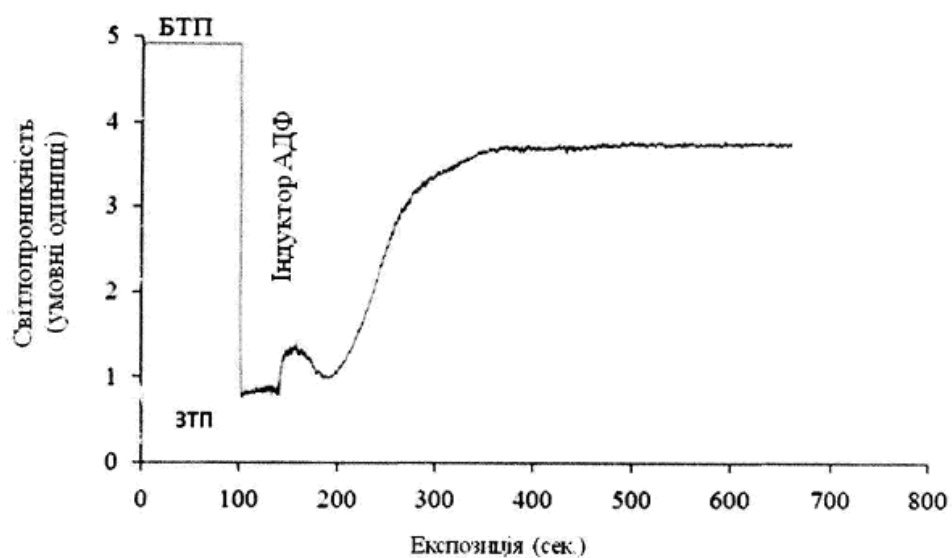


Fig. 4

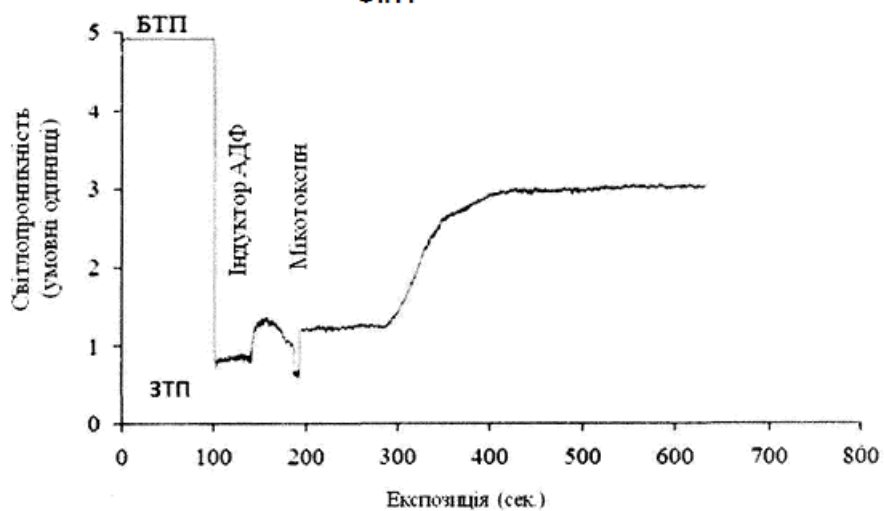


Fig. 5