

Ю.С. Сухарев¹, С.О. Гужвинська¹, С.Ю. Сухарев², І.В. Головіна²

¹ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААНУ, вул. Пушкінська, 83, Харків, 61023, Україна, тел.: +38 066 498 48 11

²Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, площа Свободи, 4, Харків, 61077, Україна, e-mail: Yuriy_sukharev@mail.ru

СПОСІБ ІМУНОБІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI*

Приведені відомості про вперше створений імунобіосенсор для ідентифікації ентеротоксинів E. coli, відповідальних за розвиток діарейного синдрому при колібактеріозі. Біосенсор реєстрував величину світлового потоку розсіяваного антитілами до кон'югату ST/LT ентеротоксинів, іммобілізованих на монодисперсних полістиролових латексах, що аглютинували у присутності ентеротоксинів. Час визначення концентрації ентеротоксинів в досліджуваних зразках – 5 хвилин. Представлені дані про концентрацію ентеротоксинів в досліджуваних зразках, а також по селективності біосенсора. Розроблений біосенсор характеризується високою операційною стабільністю, відтворюваністю і придатний для використання в реальних умовах.

Ключові слова: Escherichia coli, ентеротоксини, біосенсор, полістиролові латекси, кон'югат.

За даними світової літератури, провідним елементом оцінки патогенності *E. coli* є наявність у неї генів, що детермінують синтез ентеротоксинів — термостабільного (ST) і термолабільного (LT), відповідальних за розвиток діарейного синдрому при колібактеріозі [9, 10]. У зв'язку з цим, при експрес-діагностиці необхідна ідентифікація цих факторів патогенності [1]. Але це пов'язано зі значними труднощами, головним чином, з недосконалістю сучасних методів визначення токсигенності *E. coli* [4, 8].

Останнім часом найбільшого розвитку набули методи аналізу, які дозволяють судити про присутність речовини та її концентрації за характером і величиною впливу на певний біологічний матеріал, взятий як індикаторний [2, 5]. Такі аналітичні пристрої отримали назву «біосенсори» або «біочіпи» [3, 6]. У зв'язку з цим була поставлена мета розробити спосіб визначення ентеротоксинів *E. coli* за допомогою імунобіосенсора для діагностики колібактеріозу.



Матеріали і методи

Конструювання імунобіосенсора. Антитіла до кон'югату ST/LT- ентеротоксинів, які були вилучені з гіперімунних антитоксичних сироваток крові кролів за допомогою імуносорбенту, розводили у 0,05 М гліцин-HCl буфері до одержання 1,0–1,2% концентрації, а монодисперсні полістиролові латекси з діаметром 0,31 мкм (Росія) — у співвідношенні 1:3 гліциновим буфером рН 8,0–8,2; потім в кюветі нефелометра змішували рівні об'єми суспензії латексів і розчину антитоксинів, суміш витримували впродовж 1–2 годин при 37 °С періодично струшуючи, після чого додавали дві частини гліцинового буфера, який містив 1,0% гліцерину і витримували у холодильнику 3–5 днів при 4 °С. Перед застосуванням біотрансд'юсер струшуювали.

У ролі фізичного трансд'юсера використовували нефелометр 2100N (HACH, Ratio™), який реєстрував величину світлового потоку розсіюваного антитілами, іммобілізованими на монодисперсних полістиролових латексах, що аглютинували під дією ентеротоксинів.

Досліджуваним матеріалом були фекалії хворих на діарею і вміст тонкого кишечника полеглих від колібактеріозу телят. Кишковий вміст і фекалії центрифугували при 4000–6000 g протягом 20–40 хвилин, збирали супернатант і концентрували його у 5 разів ПЕГ з молекулярною масою 35000–40000 D.

Облік реакції. До біотрансд'юсера додавали 0,5 мл досліджуваної рідини, витримували 5 хвилин і кювети встановлювали у нефелометр. При наявності в реакційній суміші гомологічних антитілам токсичних речовин, відбувалася аглютинація латексів. В контролі використовували біотрансд'юсер виготовлений з антитіл нормальної кролячої сироватки крові іммобілізованих на латексах, які не реагували з ентеротоксинами *E. coli*. Різниця у показниках розсіювання світла між дослідними і контрольними зразками, що реєструвалася нефелометром, свідчила про наявність ентеротоксинів *E. coli*.

Кількісне визначення ентеротоксинів в досліджуваних зразках проводили за даними калібрувальної кривої залежності величини розсіювання світла від середньої концентрації ентеротоксинів, яку розраховували за формулою Калькара: $\text{мг/мл} = 1,45E_{280} - 0,74E_{260}$ (табл. 1).

Результати дослідження та їх обговорення

Специфічність імунобіосенсора, тобто здатність ідентифікувати тільки ту речовину, для визначення якої він розроблений, була підтвержена шляхом постановки тесту з безклітинним супернатантом добової культури токсигенного штаму *Proteus vulgaris* і синтетичним стерильним середовищем для культивування токсигенних штамів *E. coli* [7].



Таблиця 1
Концентрація ентеротоксинів *E. coli* в фекаліях хворих і вмісті тонкого кишечника
полеглих телят, яка визначається імунобіосенсором

Table 1
Concentration of enterotoxins *E. coli* in patients excrements and contents of small
intestine of the lost calves, defined by immunobiosensor

Досліджуваний зразок	Величина розсіювання світла (NTU) $\bar{X} \pm s, n=4$	Концентрація ентеротоксина (мкг/мл) $\bar{X} \pm s, n=4$	Рд-к
Фекалії	$74,75 \pm 1,25$	$3,12 \pm 0,74$	$\leq 0,05$
Контроль	$5,00 \pm 0,81$	–	
Вміст кишечника	$97,50 \pm 17,00$	$6,24 \pm 0,85$	$\leq 0,05$
Контроль	$5,00 \pm 0,81$	–	

Величина розсіювання світла безклітинного супернатанта, яка містила токсин *P. vulgaris*, і стерильного середовища культивування токсигених штамів, достовірно не відрізнялася від контролю (табл. 2.).

Таблиця 2
Величина розсіювання світла (NTU) безклітинного супернатанту *P. vulgaris*,
стерильного середовища культивування токсигених штамів *E. coli* і контролю,
яка визначається імунобіосенсором

Table 2
Size of light dispersion (NTU) of cell-free supernatant *P. vulgaris*, the sterile
environment of cultivation toxigenic strains *E. coli* and the control,
defined by immunobiosensor

Досліджувана речовина	Величина розсіювання світла (NTU) $\bar{X} \pm s, n=4$	Рд-к
Безклітинний супернатант <i>P. vulgaris</i>	$7,00 \pm 0,85$	$\geq 0,05$
Стерильне середовище культивування <i>E. coli</i>	$6,50 \pm 0,91$	$\geq 0,05$
Контроль	$5,00 \pm 0,91$	–

Таким чином, розроблений спосіб ідентифікації ентеротоксинів *E. coli* за допомогою імунобіосенсора дає змогу аналізувати складні суміші на присутність ентеротоксинів *E. coli*, без їх попереднього видалення і очистки; виявляти дуже низькі концентрації ентеротоксинів у малих



зразках; здійснювати експрес-діагностику колібактеріозу, що дозволяє своєчасно проводити протиепідеміологічні і профілактичні заходи, а також епізоотологічний моніторинг за присутністю і розповсюдженням токсигенних штамів кишкової палички у навколишньому середовищі.

Наступний етап роботи передбачає адаптацію імунобіосенсора до ветеринарної практики, розробку оптимальних алгоритмів його застосування для поліпшення технологічності, підвищення ефективності та зменшення вартості діагностичних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Александркин А.П., Матевосян К.Ш., Белоновская О.С., Серебряков С.Н.* Иммуноферментная тест-система для определения термолабильного энтеротоксина эшерихий // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии: Сб. научн. тр. — М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2004—2005. — С. 53—56.
2. *Божков А.И.* Биотехнология (Фундаментальные и промышленные аспекты) — Харьков. — 2008. — С. 292—303.
3. *Варфоломеев С.Д., Березин И.В.* Физическая химия (Современные проблемы). М. — Химия. — 1982. — С. 68—94.
4. *Иванов А.С.* Современные подходы к микробиологической диагностике и терапии инфекционных диарей // Болезни органов пищеварения. — 2004. — № 2. — С. 2—10.
5. *Мазена В.Н., Орлова К.А., Бруснигина Н.Ф.* Метод ПЦР в диагностике острых кишечных инфекций // Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний. — Н.Новгород. — 2006. — С. 127—128.
6. *Солдаткин О.О., Пешкова В.М., Дзядевич С.В., Ёльска Г.В.* Кондуктометричний біосенсор на основі триферментної системи для визначення сахарози // Біотехнологія. — Т. 1. — № 1. — 2008. — С. 116—122.
7. *Сухарев Ю.С.* Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе). — Харьков: Коллегиум. — 2009. — 92 с.
8. *Gomi H., Jiang Z.-D., Adachi J.A., Ashley D., Lowe B., Verenkar M.P., Steffen R., DuPont H.L.* In Vitro Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Enteropathogens Causing Traveler's Diarrhea in Four Geographic Regions // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2001. — 45. — P. 212—216.
9. *Thielman N.M., Guerrant R.L.* Acute infectious diarrhea // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — V. 350 (1). — P. 38—47.
10. *Wingate D., Phillips S.E., Lewis S.J.* Guidelines for adults on self-medication for the treatment of acute diarrhea // *Aliment. Pharmacol Ther.* — 2001. — № 15. — P. 773—782.

Ю.С. Сухарев¹, С.А. Гужвинская¹, С.Ю. Сухарев², И.В. Головина²

¹ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»
НААНУ, ул. Пушкинская, 83, Харьков, 61023, Украина, тел.: +38 066 498 48 11
²Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, площадь Свободы,
4, Харьков, 61077, Украина, e-mail: Yuriy_sukharev@mail.ru

СПОСОБ ИММУНОБИОСЕНСОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНТЕРОТОКСИНОВ *ESCHERICHIA COLI*

Реферат

Приведены сведения о впервые созданном иммунобиосенсоре для идентификации энтеротоксинов *E. coli*, ответственных за развитие диарейного синдрома при колибактериозе. Биосенсор регистрировал величину светового потока рассеиваемого антителами к конъюгату ST/LT энтеротоксинов, иммобилизованными на монодисперсных полистироловых латексах, агглютинировавших в присутствии энтеротоксинов. Время определения концентрации энтеротоксинов в исследуемых образцах — 5 минут. Представлены данные о концентрации энтеротоксинов в исследуемых образцах, а также по селективности биосенсора. Разработанный иммунобиосенсор характеризуется высокой операционной стабильностью, воспроизводимостью и пригоден для использования в реальных условиях.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, энтеротоксины, биосенсор, полистироловые латексы, конъюгат.



Yu.S. Suharev¹, S.O. Guzhvinska¹, S.Yu. Suharev², I.V. Golovina²

¹ SNC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» NAAC, 83, Pushkinska str., Kharkov, 61023, Ukraine, tel.: +38 066 498 48 11

²Kharkov National University named after V.N. Karazin, 4, square Svobody, Kharkov, 61077, Ukraine, e-mail: Yuriy_suharev@mail.ru

METHOD OF IMMUNOBIOSENSOR DETERMINATION OF ENTEROTOXINS *ESCHERICHIA COLI*

Summary

The information over is brought about the first created immunobiosensor for identification of enterotoxins of *E. coli*, cause development of diarrheal syndrome at colibacteriosis. The touchcontrol registered the size of light stream dispersed by antibodies to conjugate ST/LT enterotoxins, immobilized on monodispersible polystyrene latexs, agglutinating in presence of enterotoxins. Time of determination of enterotoxins concentration in the investigated standards is 5 minutes. Data are presented on the concentration of enterotoxins in the investigated standards, and also on selectivity of touchcontrol. Constructed immunobiosensor is characterized by high operating stability, by reproducibility and it is suitable for use in the real life environment.

Key words: *Escherichia coli*, enterotoxins, touchcontrol, polystyrene latexs, conjugate.

