

НОВИЙ ЕКСПРЕС-МЕТОД БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI*

Сухарев Ю.С.¹, Гужвинська С.О.², Сухарев С.Ю.³

*Харківська державна зооветеринарна академія¹
ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини»²*

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна³

Запропоновано новий експрес-метод визначення ентеротоксинів *Escherichia coli*, що заснований на здатності ентеротоксинів активувати клітинну аденілат — і гуанілатциклазу, що в свою чергу, викликає істотне збільшення внутрішньоклітинного рівня цАМФ і цГМФ, які є медіаторами дезагрегуючої дії на тромбоцити ссавців. Оцінка проводиться біотранс'юсером, який під дією ентеротоксинів розпізнає та перетворює інформацію про зміни агрегаційної активності тромбоцитів у електричний сигнал, що фіксується фізичним транс'юсером за допомогою фотометричного агрегометра.

Ключові слова: експрес-метод, *Escherichia coli*, ентеротоксини, біосенсор, тромбоцити.

New express-method of biosensory determination of enterotoxins of *Escherichia coli*. Sukharev Y.S., Guzhvinskaya, Sukharev S.Y. — The new express-method of determination of enterotoxins of *Escherichia coli* is offered, that based on ability of enterotoxins to activate cellular adenilat — and guanilatcyclazu, that in same queue, causes the substantial increase of into a cell level of cAMP and cGMP, which are the neurohumors of the disaggregating operating on the thrombocytes of mammals. An estimation is conducted biotransformer, which under the action of enterotoxins recognizes and converts information about the changes of activity of aggregating of thrombocytes in an electric signal that is fixed physicaltransformer by photometric agregometra.

Key words: express-method, *Escherichia of coli*, enterotoxins, touchcontrol, thrombocytes.

ВСТУП

Одним з найбільш поширених серед новонароджених сільсько-господарських тварин інфекційних захворювань, яке викликають *Escherichia coli*, є колібактеріоз, що створює одну з найсерйозніших проблем для сучасної ветеринарної медицини [1; 2; 3].

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 [4]. У зв'язку з цим при експрес-діагностиці колибактеріозу необхідна ідентифікація цих факторів патогенності. Але це пов'язано зі значними труднощами, головним чином, з недосконалістю сучасних методів визначення токсигенності *E.coli* [5].

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

Останнім часом найбільший розвиток набули методи аналізу, які дозволяють судити про присутність речовини або її кількісного вмісту за характером і величиною впливу на певний організм (клітини або тканини), взятий як індикаторний [6]. Аналітичним сигналом при цьому є зміна стану життєдіяльності організму, тобто його реакція на подразнювач, яка викликає порушення життєвих функцій індикаторного організму або його загибель [7]. Такі аналітичні пристрої отримали назву "біосенсиори" або "біочіпи" [8].

У зв'язку з цим була поставлена мета розробити новий експрес-метод визначення ентеротоксинів *E.coli* за допомогою тромбоцитарного біосенсора, при діагностиці колибактеріозу сільськогосподарських тварин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Фекалії хворих на діарею телят, мікотоксин *Fusarium graminearum*, кров барана, 14% розчин сульфату магнію, розчин тринатрієвої солі аденозин-5-дифосфорної кислоти (АДФ), 0,85% розчин хлориду натрію, холодильник, агрегометр DAMON/IEC DIVISION (Needham heights, Massachusetts, U.S.A.), скляні кювети, agar (Difco Laboratories, USA).

Дезагрегуючу активність тромбоцитів досліджували фотометричним методом з графічним записом на самописці. На графіку реєстрували максимальний відсоток дезагрегованих тромбоцитів, час і швидкість токсин-індукованої дезагрегації.

Визначення білка проводили спектрофотометричним методом Варбурга і Христіана при 260 і 280 нм. Концентрацію білка розраховували за формулою Калькара:

$$\text{мг/мл} = 1,45E_{280} - 0,74E_{260}$$

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В основу створення біосенсора покладена здатність ентеротоксинів *E.coli* активувати клітинну аденілат – і гуанілатциклазу, що

в свою чергу, викликає істотне збільшення внутрішньоклітинного рівня цАМФ і цГМФ, які є медіаторами дезагрегуючої дії на тромбоцити ссавців [9], (рис. 1).

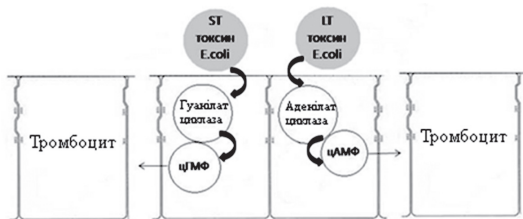


Рис. 1. Схема дезагрегуючої дії ентеротоксинів *E.coli* на тромбоцити

Новизна запропонованого способу полягала в тому, що за допомогою автоматичної системи швидко і достовірно визначали наявність ентеротоксинів *E. coli* у фекаліях телят ще до клінічного прояву хвороби, виключаючи при цьому елемент суб'єктивності, пов'язаний з візуальною оцінкою результатів аналізу.

Отримання тромбоцитів. З сонної артерії барана, масою 55-60 кг, відбирали 10 мл крові в пробірку з антикоагулянтном (14% розчин сульфата магнію) у співвідношенні 1:9, і відстоювали протягом 60 хвилин при кімнатній температурі для осадження еритроцитів, після чого відокремлювали плазму, що містила $270-500 \cdot 10^3$ /мл тромбоцитів, в стерильну пробірку. При наявності в розчині еритроцитів плазму центрифугували 10 хвилин при 200 g.

Конструювання біосенсора. Конструктивно біосенсор являв собою комбінований прилад, що включав біологічний експресний метод і автоматичний аналіз, і складався з двох перетворювачів (трансд'юсерів) – біологічного і фізичного. В якості біологічного трансд'юсера, використовували скляні кювети агрегометра, заповнені на 2/3 об'єму тромбоцитами, іммобілізованими у 0,3% напіврідкому агарі, що дозволяло їм закріплюватися, не вимиватися з біошару, зберігати життєздатність і активність ферментних систем протягом тривалого часу.

У ролі фізичного трансд'юсера використовували агрегометр, який перетворює оптичне зображення дезагрегованих під дією ентеротоксинів *E.coli*, тромбоцитів у електричний сигнал, що реєструвався самописцем.

Облік реакції. У якості досліджуваного матеріалу використовували фекалії хворих на діарею телят. Фекалії центрифугували при 4000-6000 g протягом 20-40 хвилин і збирали супернатант.

У кюветі нефелометра змішували рівні частини охолодженого до 37 °С 0,3% агара і тромбоцитів, додавали 0,2 мл 3·10⁶ М розчину АДФ, що є індуктором агрегації тромбоцитів у концентрації 25 мкг/мл. Кювети витримували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин, після чого додавали 0,5 мл досліджуваних зразків із вмістом білка не більше 30 мкг/мл, так як більш високі концентрації зменшували дезагрегуючі властивості ентеротоксинів, і інкубували 30 хвилин (час необхідний для дифузії токсинів у агар і початку реакції). Біотрансд'юсер встановлювали в агрегометр, який перетворював оптичне зображення дезагрегованих під дією ентеротоксинів тромбоцитів в електричний сигнал, що реєструвався самописцем.

Постановці реакції передували два контролю. Негативний контроль: до біотрансд'юсера додавали 0,1-0,3 мл антикоагулянту і 0,2 мл 0,85% NaCl, (рис. 2).

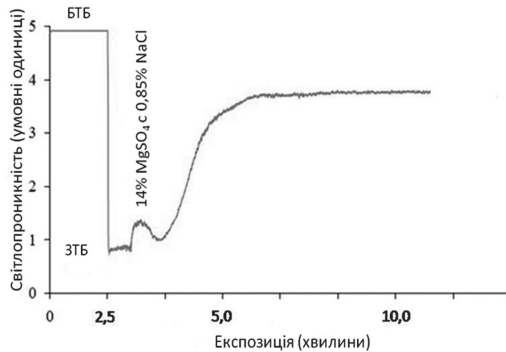


Рис. 2. Негативний контроль БТБ-безтромбоцитарний біотрансд'юсер; ЗТБ-збагачений тромбоцитами біотрансд'юсер

Позитивний контроль: до біотрансд'юсера додавали 0,1-0,3 мл антикоагулянту і 0,1-0,3 мл розчину АДФ, (рис. 3).

Дезагрегація тромбоцитів при негативному контролі є достовірним показником наявності у досліджуваному матеріалі ентеротоксинів *E.coli*, (рис. 4).

Специфічність тромбоцитарного біотрансд'юсера була підтвержена у досліді з мікотоксином *Fusarium graminearum* у концентрації 10-20 мкг/мл, який індукував агрегацію тромбоцитів (рис. 5).

З метою можливої комерціалізації розробленого біосенсора були проведені досліді з вивчення стабільності тромбоцитарного біотрансд'юсера за певних умов його зберігання. Біотрансд'юсер зберігали при 4 °С і 22 °С упродовж тижня. Встановили, що активність

біотрансд'юсера, який зберігався при температурі 4 °С, залишалася майже стабільною упродовж тижня. Біотрансд'юсер, який зберігався при 22 °С, втрачав активність вже через 2-3 доби. Втрата активності біотрансд'юсера була пов'язана із загибеллю тромбоцитів.

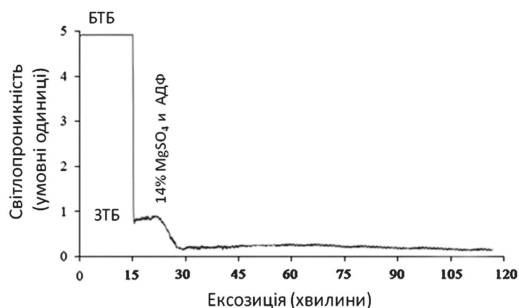


Рис. 3. Позитивний контроль

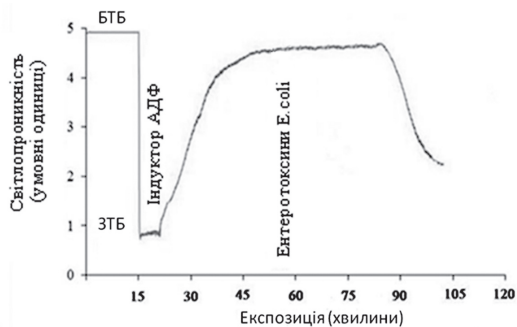


Рис. 4. Дезагрегуюча дія ентеротоксинів *E. coli* на тромбоцити

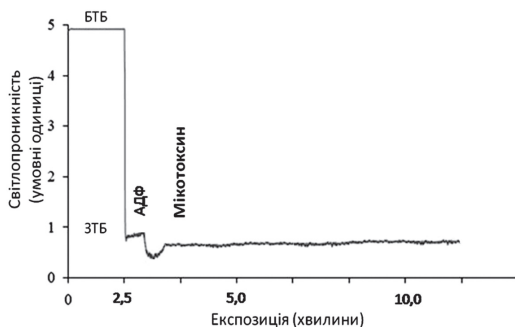


Рис. 5. Реакція агрегації тромбоцитів індукована мікотоксином *Fusarium graminearum*

ВИСНОВКИ

1. Вперше запропонований експрес-метод визначення ентеротоксинів *E.coli*, що базується на здатності ентеротоксинів активувати клітинну аденілат — і гуанілатциклазу, що в свою чергу, викликає істотне збільшення внутрішньоклітинного рівня цАМФ і цГМФ, які є медіаторами дезагрегуючої дії на тромбоцити ссавців. Оцінка проводиться біотрансд'юсером, який під дією ентеротоксинів розпізнає та перетворює інформацію про зміни агрегаційної активності тромбоцитів у електричний сигнал, що фіксується фізичним трансд'юсером за допомогою фотометричного агрегометра.

2. Основними перевагами методу є: автоматизація обліку і аналізу одержаних даних, специфічність — здатність аналізувати складні суміші на присутність ентеротоксинів без передчасної їх очистки; чутливість, здатність до виявлення дуже низьких концентрацій ентеротоксинів у малих зразках; швидка відповідь; безпека при використанні; точність результатів; доступність для масового виробництва, можливість здійснювати експрес-діагностику колибakterіозу.

Наступний етап роботи передбачає відпрацювання методики зберігання тромбоцитарного біотрансд'юсера, а також адаптацію біосенсора до ветеринарної практики, розробку оптимальних алгоритмів його застосування для поліпшення технологічності, підвищення ефективності та зменшення вартості діагностичних досліджень.

Висловлюємо подяку завідуючій лабораторії кріопротекторів НДІ кріобіології та кріомедицини НАН України к.м.н. Компанієць А.М. за допомогу у проведенні досліджень.

Література

1. Олійник Л. В. Фактори патогенності шигетоксинпродукуючих ешерихій, виділених від здорової великої рогатої худоби / Л.В.Олійник, Л.В. Зощенко // Вісник Білоцерківського ДАУ. — Біла Церква. — 2004. — № 28. — С. 166-171.
2. Липин А.В. Диспепсия телят //Ветеринарный консультант. — 2002. — №15. — 28 с. — С.6-7.
3. Ломако Ю.В. Эпизоотический мониторинг колибakterиоза новорожденных телят в Республике Беларусь/ Ю.В. Ломако, Н.Н. Андросик // Ветеринарная медицина Беларуси. — 2002. — N2. — С. 15-17.
4. 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.
5. Feng P. Diarrheagenic Escherichia coli /P. Feng, S.D. Weagant // Bacteriological Analytical Manual September 2002. — 8th Edition. — P.15-20.

6. Иванов А.С. Современные подходы к микробиологической диагностике и терапии инфекционных диарей //Болезни органов пищеварения.- №2. — 2004. — С. 5-25.
7. Божков А.И. Биотехнология (Фундаментальные и промышленные аспекты). — Харьков. — 2008. — С.292-303.
8. Солдаткін О.О. Кондуктометричний біосенсор на основі триферментної системи для визначення сахарози /О.О.Солдаткін, В.М.Пешкова, С.В.Дзядевич, Г.В.Єльска //Біотехнологія. — т. 1. — № 1. — 2008. — С. 116-122.
9. Будников Г. К. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрорефлекторами /Г.К. Будников, В. Н. Майстренко, Ю. И. Муринов. — М. — Наука. — 1994. — 239 с.

Новый экспресс-метод биосенсорного определения энтеротоксинов *Escherichia coli*. Сухарев Ю.С., Гужвинская С.А., Сухарев С.Ю. — Предложен новый экспресс-метод определения энтеротоксинов *Escherichia coli*, основанный на способности энтеротоксинов активировать клеточную аденилат — и гуанилатциклазу, что, в свою очередь, вызывает существенное увеличение внутриклеточного уровня цАМФ и цГМФ, которые являются медиаторами дезагрегирующего действия на тромбоциты млекопитающих. Оценка проводится биотрансдюсером, который под действием энтеротоксинов распознаёт и преобразовывает информацию об изменениях агрегационной активности тромбоцитов в электрический сигнал, который фиксируется физическим трансдюсером с помощью фотометрического агрегометра.

Ключевые слова: экспресс-метод, *Escherichia coli*, энтеротоксины, биосенсор, тромбоциты.