

УДК: 619;616.98:579.842.11:631

Неспецифический клеточный биосенсор на основе инфузорий *Stylonichia mytilus* для определения энтеротоксигенных *Escherichia coli*
Ю.С.Сухарев

Харьковская государственная зооветеринарная академия (Малая Даниловка, Харьковская обл., Украина)
Yuriy_sukharev@mail.ru

Сконструирован неспецифический клеточный биосенсор на основе инфузорий *Stylonichia mytilus* для идентификации энтеротоксигенных *E. coli*, по их способности синтезировать энтеротоксины. Биосенсор определяет относительные количества и сроки максимального накопления энтеротоксинов. Позволяет оптимизировать культивирование токсигенных штаммов при производстве иммунизирующих препаратов. Исключает фактор субъективности, связанный с визуальной оценкой результатов исследований. Позволяет анализировать сложные смеси на присутствие энтеротоксинов *E. coli* без предварительной их очистки. Выявляет низкие концентрации энтеротоксинов в малых образцах. Характеризуется быстротой ответа, безопасностью при использовании, высокой точностью результатов и доступностью для массового производства.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, *Stylonichia mytilus*, энтеротоксины, неспецифический биосенсор, диагностика.

Неспецифічний клітинний біосенсор на основі інфузорій *Stylonichia mytilus* для визначення ентеротоксигенних *Escherichia coli*
Ю.С.Сухарєв

Сконструйований неспецифічний клітинний біосенсор на основі інфузорій *Stylonichia mytilus* для ідентифікації ентеротоксигенних *E. coli*, по їх здатності синтезувати ентеротоксини. Біосенсор визначає відносні кількості і терміни максимального накопичення ентеротоксинів. Дозволяє оптимізувати культивування токсигенних штамів при виробництві імунізуючих препаратів. Виключає чинник суб'єктивності, пов'язаний з візуальною оцінкою результатів досліджень. Дозволяє аналізувати складні суміші на присутність ентеротоксинів *E. coli* без попереднього їх очищення. Виявляє низькі концентрації ентеротоксинів в малих зразках. Характеризується швидкістю відповіді, безпекою при використанні, високою точністю результатів і доступністю для масового виробництва.

Ключові слова: *Escherichia coli*, *Stylonichia mytilus*, ентеротоксини, неспецифічний біосенсор, діагностика.

Heterospecific cellular biosensor on the basis of infusoria *Stylonichia mytilus* for determination of enterotoxigenic *Escherichia coli*
Yu.S.Suharev

Heterospecific cellular biosensor was constructed on the basis of infusoria *Stylonichia mytilus* for identification of enterotoxigenic *E. coli*, by their ability to synthesize enterotoxins. The biosensor determines the relative amounts and terms of maximal accumulation of enterotoxins. It allows to optimize cultivation of toxigenic strains at the production of immunizing preparations. It eliminates the factor of subjectivity related to visual estimation of results of researches. The biosensor allows to analyse difficult mixtures for presence of enterotoxins of *E. coli* without their pre-cleaning. It detects low concentrations of enterotoxins in small standards. The biosensor is characterized by quickness of response, safety at the use, high exactness of results and availability for a mass production.

Key words: *Escherichia coli*, *Stylonichia mytilus*, enterotoxins, heterospecific biosensor, diagnostics.

Введение

Первые работы, оценивающие возможность использования биосенсоров на основе одноклеточных организмов для характеристики токсических веществ, появились в конце 1990-х годов (Тернер, 1992).

Уникальные возможности для экспресс-анализа бактериальных токсинов могут обеспечить неспецифические клеточные биосенсоры на основе инфузорий, позволяющие проводить тестирование на легко и быстро воспроизводимых, генетически однородных организмах, имеющих

значительно более низкую стоимость по сравнению с другими биологическими объектами (Олійник, 2004; Зубанов и др., 2006; Поляков и др., 2006; Шпонько, 2007).

В связи с этим целью исследований было расширение технологических возможностей использования инфузорий в качестве тест-объекта для индикации энтеротоксигенных *E. coli*, относительного определения количества и сроков максимального накопления термолабильного (LT) и термостабильного (ST) энтеротоксинов в среде культивирования. Это позволит оптимизировать сроки культивирования при производстве вакцинных препаратов, идентифицировать энтеротоксин-продуцирующие штаммы при серологической диагностике колибактериоза, своевременно проводить профилактические и лечебные мероприятия, направленные на ликвидацию этого заболевания, а также осуществлять эпидемиологический мониторинг за присутствием и распространением токсигенных штаммов кишечной палочки в окружающей среде.

Новизна разработанного метода заключается в том, что, в отличие от простого биотестирования, инфузории *Stylonichia mytilus*, выполняющие функцию биологического элемента распознавания энтеротоксинов *E. coli*, быстро и достоверно определяют их содержание и очень низкие концентрации в малых образцах, а физический преобразователь, состоящий из оптической и электронной подсистемы, осуществляет подсчет погибших под действием токсинов инфузорий и оценку степени токсичности в автоматическом режиме, что исключает фактор субъективности при визуальной оценке результатов.

Материалы и методы

Существенные морфологические и физиологические различия инфузорий обуславливают разнообразие сфер их использования в биологической практике, в связи с чем в экспериментах использовали инфузорий четырех видов: *Colpoda steinii*, *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena pyriformis* и *Stylonichia mytilus*, любезно предоставленные заведующим кафедрой зоологии Харьковского национального университета им. В.Н.Каразина к.б.н. А.Ю.Утевским.

Культивирование инфузорий проводили в закрытых чашках Петри в среде Лозина-Лозинского, которую готовили на дистиллированной воде с добавлением следующих солей (г/л): NaCl – 0,1; KCl – 0,01; NaHCO₃ – 0,02; MgSO₄ – 0,01; CaCl₂ – 0,01, поддерживая оптимальную температуру 24–26°C.

Пересев культур производили каждый раз за сутки до постановки опыта. В качестве корма использовали сухие пекарские дрожжи, которые добавляли в среду во время пересева культуры (на 25 мл среды – 10 мкг сухих пекарских дрожжей ГОСТ 171-81). Передозировка корма недопустима, поскольку она приводит к угнетению инфузорий или их полной гибели.

В качестве исследуемого объекта были использованы штаммы кишечной палочки O9 и O26 (из коллекции НИЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААНУ, продуценты ST- и LT-энтеротоксинов, проявивших максимальную токсичность в опыте на белых беспородных мышах. Контролем служил штамм *E. coli* M-17, представляющий собой пробиотический препарат, поступающий в аптечную сеть под названием «Колибактерин» («Ромакол») и не обладающий патогенными и токсигенными свойствами. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную питательную среду культивирования штаммов *E. coli*, а также культуральный бесклеточный фильтр *Proteus vulgaris*.

Исследуемые штаммы *E. coli* выращивали раздельно на питательной среде (Finkelstein, 1983) или «Синтетической питательной среде» (Сухарев, Гнатенко, 1992) в течение 18–24 часов при 37°C, отделяли бакмассу центрифугированием при 5000 g в течение 30–40 минут или фильтрованием через стерилизующие пластины фильтра Зейтца.

Требования к условиям анализа и параметрам программы:

- температура в лунке в момент измерения не ниже 24–26°C;
- время экспозиции инфузорий в лунке после их пересадки из чашки Петри перед первым подсчетом – не менее 15 минут и зависит от установления оптимальной температуры и чистоты лунки;
- использование только суточной культуры инфузорий. Культура старшего возраста (2–3-суточная) характеризовалась нестабильной реакцией на токсические вещества и более высокой устойчивостью к ним;
- для создания оптимальных оптических условий следует обеспечить выбор такого объема раствора, чтобы его уровень в лунке не превышал 4 мм, что достигалось при внесении в лунку 6–7 капель раствора;
- оптимальная плотность инфузорий – в пределах 50–70 клеток в лунке;
- чистота лунок, критерием которой служит отсутствие в контроле подавления активности инфузорий через 60 минут после первого подсчета.

Оптическая подсистема аппаратно-программного комплекса, для регистрации погибших под действием энтеротоксинов *E. coli* инфузорий *Stylonichia mytilus*, обеспечивала надежную видимость объекта размером 200–250 мкм (инфузории *Stylonichia mytilus*) и захват в поле зрения фотокамеры всей лунки микропанели диаметром 14 мм и глубиной 6 мм.

Электронная подсистема обеспечивала: определение степени токсичности образцов в заданном числе лунок; ввод и редактирование необходимой дополнительной информации; запись полученных результатов на диск и чтение их с диска; распечатку полученных результатов на принтере.

Подсчет количества тест-организмов проводили с помощью аппаратно-программного комплекса, схема которого показана на рис. 1.

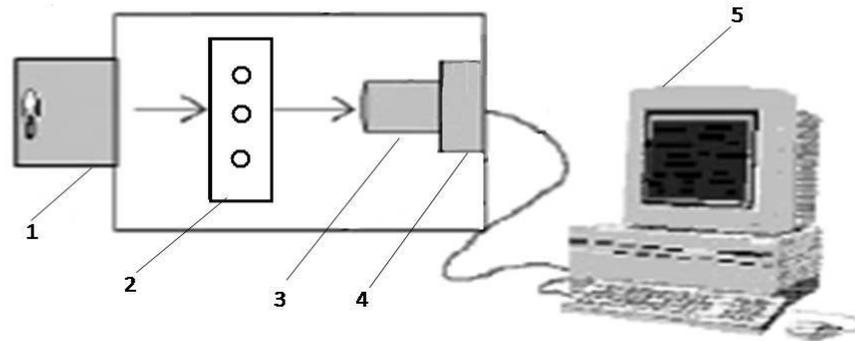


Рис. 1. Аппаратно-программный комплекс для регистрации погибших под действием энтеротоксинов *E. coli* инфузорий *Stylonichia mytilus*: 1 – осветитель; 2 – планшет с инфузориями; 3 – объектив микроскопа; 4 – цифровая фотокамера; 5 – ПК IBM/PC-486 с программным обеспечением

Испытания начинали с внесения в лунки полистиролового планшета по три капли тест-организмов; при этом в лунку попадало около 60 инфузорий. Для тестирования одной пробы использовали четыре повторности, при этом 2 лунки были контрольными. В контроле использовали стерильную среду Лозина-Лозинского, в которой инфузории должны оставаться живыми.

Исследуемый раствор тестируемых веществ вносили пастеровской пипеткой в лунки планшета в количестве 4 капель, не касаясь поверхности среды с внесенными ранее инфузориями, после чего добавляли 0,5–1,0 % раствор трипанового синего.

Результаты и обсуждение

В результате исследования четырех видов инфузорий пришли к выводу, что в данном тесте можно использовать лишь один вид – *Stylonichia mytilus*, так как только он оказался чувствительным к выделяемым *E. coli* энтеротоксинам. Представители других видов инфузорий не погибали в присутствии энтеротоксинов *E. coli*, даже при высоких их концентрациях.

Среди признаков, присущих прочим инфузориям, данный вид обладал рядом уникальных свойств. Способность образовывать цисты покоя, устойчивые к высушиванию, и быстрый переход от стадии покоя к активной жизнедеятельности позволяли получать на основе культуры *Stylonichia mytilus* удобный в использовании сухой препарат-диагностикум с длительным сроком годности (24 месяца). Существенным являлось и то обстоятельство, что гибель *Stylonichia mytilus* сопровождалась их полным лизисом, что весьма удобно при подсчете оставшихся в живых инфузорий.

Существенное значение при создании тест-системы имело нормирование ее начального состояния, которое зависело от физиологического состояния входящих в нее тест-объектов, то есть от фазы роста культуры и стадии жизненного цикла каждой отдельной инфузории.

Установлено, что оптимальным состоянием культуры инфузорий, для получения чувствительной ответной реакции, являлась фаза экспоненциального роста (суточная культура инфузорий), в связи с чем, после добавления корма, чашку Петри с культурой не трогали в течение 4-х часов для получения концентрированной культуры инфузорий.

Так как тест-система в общем случае представляла собой неоднородную совокупность клеток, их гибель происходила не одновременно, а с некоторым временным разбросом. Гибель инфузорий состояла из трех этапов: снижение двигательной активности (вращение вокруг своей оси), полная остановка и лизис клеток.

В присутствии энтеротоксинов *E. coli* инфузории *Stylonichia mytilus* погибали в течение интервала времени, являющегося функцией концентрации токсинов.

Через 60 минут после внесения пробы результат токсикологического анализа фиксировали цифровой фотокамерой и переносили на экран монитора, где с помощью программы "Totallab" осуществляли подсчет погибших (окрашенных) инфузорий. Численность инфузорий через 60 минут экспозиции рассчитывали по формуле:

$$n = n_2 \times 100\% / n_1,$$

где n_1 – общая численность посаженных инфузорий, n_2 – общая численность инфузорий через 60 мин экспозиции.

Степень токсичности тестируемых бесклеточных супернатантов токсигенных *E. coli* определяли по количеству выживших инфузорий *Stylonichia mytilus*, в соответствии со шкалой, указанной в табл. 1.

Таблица 1.
Степень токсичности культуральных бесклеточных супернатантов энтеротоксигенных штаммов *E. coli*, определяемая по количеству выживших инфузорий *Stylonichia mytilus*

Степень токсичности	Выживаемость инфузорий (%)
Нетоксичный	100–81
Слаботоксичный	80–50
Токсичный	49–0

Зависимость гибели инфузорий *Stylonichia mytilus*, в бесклеточных супернатантах токсигенных штаммов *E. coli*, от экспозиции показана на рис. 2.

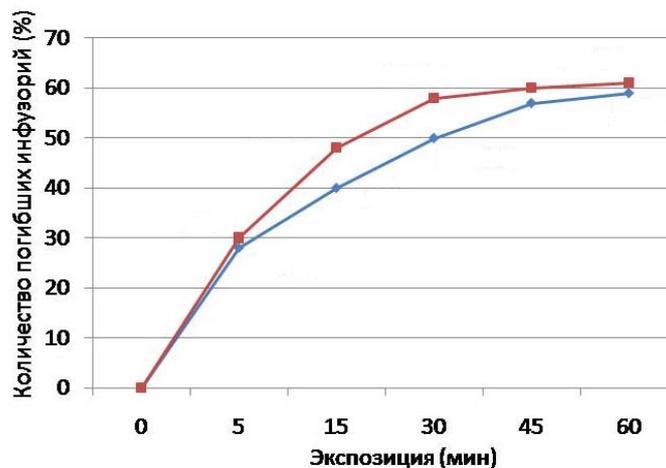


Рис. 2. Зависимость гибели инфузорий *Stylonichia mytilus*, в бесклеточных супернатантах токсигенных штаммов *E. coli*, от экспозиции. А – супернатант LT-продуцирующего штамма; Б – супернатант ST-продуцирующего штамма

Для получения достоверных данных опыт многократно повторяли, затем подсчитывали средний показатель. Чем выше процент лизированных (погибших) инфузорий, тем более токсичным являлся культуральной супернатант, а исследуемый штамм *E. coli* соответственно – токсигенным (рис. 3).

Были определены относительные количества и сроки максимального накопления LT- и ST-энтеротоксинов *E. coli* в питательных средах различного состава. Для этого токсигенные штаммы кишечной палочки культивировали в среде Finkelstein и Синтетической питательной среде при 37°C и через 18, 20 и 24 часа осуществляли контроль токсичности, определяя количество погибших *Stylonichia mytilus* в среде культивирования. В качестве контроля использовали нетоксигенный штамм, который выращивали в тех же условиях, стерильную среду культивирования токсигенных штаммов и культуральный бесклеточный супернатант *P. vulgaris*. Максимальное накопление энтеротоксинов отмечалось через 24 часа культивирования, следствием чего был более высокий процент гибели инфузорий в супернатантах культур *E. coli* (табл. 1).

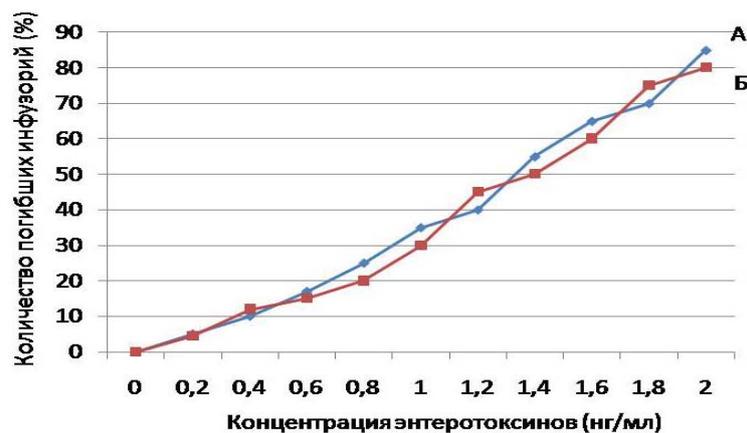


Рис. 3. Зависимость гибели инфузорий *Styloichia mytilus*, в бесклеточных супернатантах токсигенных штаммов *E. coli* от концентрации энтеротоксинов. А – супернатант LT-продуцирующего штамма; Б – супернатант ST-продуцирующего штамма

Таблица 1.

Количество *Styloichia mytilus*, погибших в бесклеточных супернатантах штаммов *E. coli*, выращенных в питательных средах различного состава

Исследуемый образец	Время культивирования (ч)	Погибшие <i>Styloichia mytilus</i> (%), $\bar{X} \pm s, n=4$	
		Синтетическая среда	среда Finkelstein
Токсигенный штамм <i>E. coli</i> (ST ⁺)	18	55,0 ± 2,3	51,5 ± 2,5
	20	60,0 ± 2,5	58,5 ± 2,5
	24	97,5 ± 2,5	85,5 ± 2,5
Токсигенный штамм <i>E. coli</i> (LT ⁺)	18	59,5 ± 1,5	53,5 ± 0,4
	20	63,5 ± 1,5	60,0 ± 0,5
	24	98,0 ± 1,5	87,5 ± 0,5
Нетоксигенный штамм <i>E. coli</i>	18	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,3
	20	2,5 ± 0,2	3,0 ± 0,1
	24	2,5 ± 0,2	3,0 ± 0,1
Супернатант <i>P. vulgaris</i>	–	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2

При добавлении к инфузориям бесклеточного супернатанта штамма *E. coli*, продуцирующего LT-энтеротоксин, гибель *Styloichia mytilus* составила 59,5–98,0 %, а при добавлении штамма – продуцента ST-энтеротоксина – 55,0–97,5 %. Штамм *E. coli* M-17 вызывал гибель 2,0–3,0 % *Styloichia mytilus*, такой же процент гибели (за счет спонтанно погибших инфузорий) происходил при внесении стерильной среды культивирования токсигенных штаммов и культурального бесклеточного фильтрата *P. vulgaris*.

Тенденция накопления токсинов в процессе культивирования тест-штаммов *E. coli* в среде Finkelstein была аналогична культивированию в Синтетической питательной среде, однако концентрация токсинов ниже, о чем свидетельствует более низкий процент гибели *Styloichia mytilus* при контакте с супернатантами токсигенных штаммов.

Таким образом, при тестировании токсигенных свойств кишечной палочки с помощью неспецифического биосенсора на основе инфузорий *Styloichia mytilus*, для получения достоверных результатов целесообразнее использовать более богатую питательными веществами Синтетическую среду, нежели среду Finkelstein.

Сравнивали порог чувствительности тест-реакции гибели *Styloichia mytilus* к энтеротоксинам *E. coli* и тестов: лигированной петли кишечника кролика, дермонекротической пробы на кролике, отека лап белых мышей и анальной пробы на мышатах-сосунах.

Установили, что инфузории реагировали на концентрации токсинов на один-два порядка ниже, чем теплокровные животные, о чём свидетельствуют данные табл. 2.

Таблица 2.

Порог чувствительности тест-реакций гибели *Stylonichia mytilus* и высших животных к энтеротоксинам *E. coli*

Тест-реакции	Порог чувствительности к энтеротоксинам <i>E. coli</i>
Лигированная петля кишечника кролика	50–30 мкг/мл
Дермoneкротическая проба на кролике	20–15 мкг/мл
Отек лап белых мышей	15–10 мкг/мл
Анальная проба на мышатах-сосунах	50–40 нг
Гибель <i>Stylonichia mytilus</i>	0,4–0,2 нг

Выводы

Разработанный метод идентификации энтеротоксигенных *E. coli*, с помощью неспецифического клеточного биосенсора на основе инфузорий *Stylonichia mytilus*, позволяет определять содержание энтеротоксинов в культуральных бесклеточных супернатантах *E. coli* и может применяться в условиях лабораторий, не имеющих возможности использовать специальное дорогостоящее оборудование для наблюдения за специфическими тест-реакциями, при диагностике колибактериоза.

Метод обладает высокой чувствительностью, экспрессностью, надежностью, универсальностью и малой себестоимостью. Он прост в проведении, поддается инструментализации и автоматизации, а его результаты легко интерпретируемы. По сравнению с тестами на других видах животных он обладает значительными преимуществами в экономической, методической и этической сферах.

Список литературы

- Зубанов П.А., Виноходов Д.О., Филимон Е.В. Зависимость чувствительности *Paramecium caudatum* к токсичным веществам от условий обитания // IV съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А.Овчинникова. – Пушино, 2006. – С. 90–96. /Zubanov P.A., Vinokhodov D.O., Filimon Ye.V. Zavisimost' chuvstvitel'nosti *Paramecium caudatum* k toksichnym veshchestvam ot usloviy obitaniya // IV s'ezd Obshchestva biotekhnologov Rossii im. Yu.A.Ovchinnikova. – Pushchino, 2006. – S. 90–96/
- Олійник Л.В. Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу // Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Харків, 2004. – №83. – С. 167–170. /Oliynyk L.V. Rozpovsyudzhennya esherikhiiy ta otsinka yikh patogennogo potentsialu // Veterynarna medytsyna: Mizhvidomchyy tematychnyy naukovyy zbirnyk. – Kharkiv, 2004. – №83. – S. 167–170/
- Поляков Н.Л., Виноходов Д.О., Виноходов В.О. Новый экспресс-метод определения токсичности мясопродуктов // Ученые записки Казанской академии ветеринарной медицины. – 2006. – Т.180. – С. 210–219. /Polyakov N.L., Vinokhodov D.O., Vinokhodov V.O. Novyy ekspress-metod opredeleniya toksichnosti myasoproduktov // Uchenyye zapiski Kazanskooy akademii veterinar moy meditsiny. – 2006. – T.180. – S. 210–219/
- Сухарев Ю.С., Гнатенко Г.В. Синтетическая питательная среда для получения термостабильного энтеротоксина *Escherichia coli*. А.С. СССР, МКИ 5 А 61 К 39/108. (СССР). N 4930440/13. Заявл. 28.03.91; опубл. 30.07.92, бюл.28. /Sukharev Yu.S., Gnatenko G.V. Sinteticheskaya pitatel'naya sreda dlya polucheniya termostabil'nogo enteroksina *Escherichia coli*. A.S. SSSR, MKI 5 A 61 K 39/108. (SSSR). N 4930440/13. Zayavl. 28.03.91; opubl. 30.07.92, byul.28/
- Тернер Э. Биосенсоры: основы и приложения. – М.: Мир, 1992. – 614с. /Terner E. Biosensory: osnovy i prilozheniya. – M.: Mir, 1992. – 614s./
- Шпонько Ю.Б. Совершенствование методов лечения и профилактики эшерихиоза поросят // Ветеринарная патология. – 2007. – №2. – С. 191–192. /Shpon'ko Yu.B. Sovershenstvovaniye metodov lecheniya i profilaktiki esherihioza porosyat // Veterinarnaya patologiya. – 2007. – №2. – S. 191–192/
- Finkelstein R.A. Enterotoxins: brief historical overview and introduction // Progr. Food and Nutr. Sei. – 1983. – Vol.7, №3–4. – P. 133–138.

Представлено: С.О.Гужвинською / Presented by: S.O.Guzhvins'ka

Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським / Recommended for publishing by: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 26.10.2010.