

УДК 619:614.3-078

UDC 619:614.3-078

ОПРЕДЕЛЕНИЕ САЛЬМОНЕЛЛ В МЯСЕ ПТИЦЫ И НА РАБОЧИХ ПОВЕРХНОСТЯХ ПТИЦЕВОДЧЕСКИХ И ПТИЦЕПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ

DEFINITION OF SALMONELLAS IN FOWL AND ON WORKING SURFACES POULTRY-FARMING AND POULTRY-FARM THE ENTERPRISES WITH THE HELP OF TESTS - SYSTEMS ON THE BASIS OF LATEX - AGGLUTINATION

Бровкина Анна Николаевна
к.в.н., докторант

*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной санитарии, гигиены и
экологии РАСХН, Москва, Россия*

Brovkina Anna Nikolaevna

Cand. Vet.Sci., competitor for doctor's degree
*The state scientific institute the All-Russia scientific
research institute of veterinary sanitary, hygiene and
ecology, The Russian academy of agricultural
sciences, Moscow, Russia*

Диагностические препараты, созданные на основе полимерных носителей, находят широкое применение в диагностике различных заболеваний с целью обнаружения малого количества антител или антигенов в различных субстратах. Благодаря своим физико-химическим свойствам, полимерные частицы являются удобными носителями при создании различных диагностических тест-систем в области иммуноанализа. К преимуществам реакции латекс-агглютинации можно отнести следующие моменты: простота и быстрота выполнения, отсутствие необходимости в сложной аппаратуре, воспроизводимость и точность, возможность получения больших партий стандартных и однородных полимерных суспензий

The diagnostic preparations created on the basis of polymeric carriers, find wide application in diagnostics of various diseases with the purpose of detection of small quantity of antibodies or antigens in various substrata. Due to the physical and chemical properties, polymeric particles are convenient carriers at creation of various diagnostic tests - systems in area immunoassay. It is possible to attribute the following moments to advantages of reaction of latex - agglutination: simplicity and speed of performance, absence of necessity for the complex equipment, reproducibility and accuracy, an opportunity of reception of the big parties of standard and homogeneous polymeric suspensions

Ключевые слова: РЕАКЦИЯ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ, ПОЛИМЕРНЫЕ НОСИТЕЛИ, АНТИГЕНЫ, АНТИТЕЛА, ДИАГНОСТИКА

Keywords: REACTION OF LATEX - AGGLUTINATION, POLYMERIC CARRIERS, ANTIGENES, ANTIBODIES, DIAGNOSTICS

Проблему кишечных токсикоинфекций можно отнести к одной из актуальных и далеко еще не решенных в ветеринарной и медицинской практике. В борьбе с токсикоинфекциями животных и человека, важное значение имеет повышение эффективности ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на их предупреждение, а также объективный санитарно-бактериологический контроль качества продукции животного происхождения и кормов.

Одно из ведущих мест в структуре токсикоинфекций продолжает занимать сальмонеллез. Источником заражения людей и животных наиболее часто являются продукты и корма, контаминированные

возбудителями болезни, в связи с чем большую актуальность представляет вопрос совершенствования методов их индикации, которые могли бы обеспечить более достоверную лабораторную экспертизу различных материалов и быть доступными для широкой практики.

К числу таких методов относится реакция латекс-агглютинации (РЛА).

Диагностические препараты, созданные на основе полимерных носителей (ПН), находят широкое применение в диагностике различных заболеваний с целью обнаружения малого количества антител или антигенов в различных субстратах. Благодаря своим физико-химическим свойствам, полимерные частицы являются удобными носителями при создании различных диагностических тест-систем в области иммуноанализа. К преимуществам РЛА можно отнести следующие моменты: простота и быстрота выполнения, отсутствие необходимости в сложной аппаратуре, воспроизводимость и точность, возможность получения больших партий стандартных и однородных полимерных суспензий (ПС).

Принцип работы антительных (антигенных) латексных диагностикумов основан на иммунохимической реакции между антителами (антигенами), связанными с полимерным носителем, который выполняет исключительно индикаторную функцию, и антигенами (антителами) с образованием комплекса антиген-антитело. Появление таких комплексов в виде агглютинатов позволяет проводить учет реакции невооруженным глазом.

Основным этапом создания латексных диагностикумов является специфическая адсорбция антител (антигенов) на поверхность полимера. Эффективность адсорбции определяется влиянием различных факторов

среды, свойствами иммунологического компонента и физико-химическими особенностями ПН.

В ряде стран осуществляется коммерческий выпуск латексных диагностикумов. Известны диагностические препараты, созданные на основе инертных полимерных носителей для индикации в РЛА возбудителей синегнойной инфекции Анциферова Н.Г. с соавт., 1986, стрептококкоза (1), кандидоза (2), эшерихиоза (4), стафилококковой инфекции (5) и др. Относительно низкая стоимость анализа, простота и быстрота выполнения, точность результатов делают РЛА незаменимой в качестве экспресс-метода индикации микроорганизмов. Однако, вариант диагностических тест-систем, созданных на основе полимерных носителей, сенсibilизированных антителами, практически не используется из-за трудности иммобилизации иммуноглобулинов на поверхность носителей. Эффективность адсорбции антител на поверхность ПН и, следовательно, реакционная способность диагностикумов, определяется как свойствами антител, так и физико-химическими характеристиками поверхности частиц. Анализ данных литературы показывает, что сведения о характеристиках полимерных носителей практически отсутствуют, а способы сенсibilизации полимерной поверхности антителами не детализированы и противоречивы. Для создания специфичных и высокочувствительных тест-систем необходим подбор оптимальных условий и параметров процесса их изготовления (3). Диагностические препараты, созданные на основе ПН, могут быть широко применены в РЛА для выявления соответствующих антигенов в различных субстратах. В связи с этим, проблема разработки латексных диагностикумов не теряет своей актуальности и имеет большое практическое значение.

Нами разработан способ изготовления диагностических тест-систем на основе полимерных носителей для индикации бактерий рода *Salmonella*

в объектах внешней среды, пищевых продуктах и кормах с помощью реакции латекс-агглютинации.

Создание диагностических тест-систем на основе полимерных суспензий для постановки РЛА включает в себя несколько этапов:

- первый этап состоит в выборе природы полимерной суспензии, оптимального диаметра и коэффициента вариации размеров частиц.
- второй этап – в оценке агрегативной устойчивости полимерных суспензий в растворах солей низкой концентрации и их стабильности при хранении.
- третий этап – исследование иммобилизации белков на поверхности полимерных носителей с целью определения оптимальных условий проведения адсорбции и выбор метода связывания иммуноглобулинов с поверхностью ПМ, обеспечивающего высокую специфичность и чувствительность препарата, а также его стабильность при хранении.
- четвертый этап – определение специфичности и чувствительности полученных диагностических тест-систем при индикации гомологичных микроорганизмов в различных объектах.

Оптимальным при создании диагностикумов по специфичности, чувствительности и срокам годности диагностикумов по показателю первоначальной активности являлся способ проведения активации карбоксильных групп с помощью метода «активированных эфиров». При этом, в качестве активирующего агента использовали гидроксисукцинимид, а в качестве сшивающего агента – водорастворимый карбодиимид. При создании диагностических препаратов с помощью метода «активированных эфиров» использовали иммуноглобулины диагностические сальмонеллезные поливалентные и монорецепторные к группам D и В. Контрольный препарат готовили

путем аналогичной обработки ПС без стадии сенсibilизации специфическими антителами. В качестве консерванта полученных диагностических тест-систем использовали 1%-ный раствор мертиолята натрия. Проверку специфичности полученных препаратов проводили в РЛА с культурами микроорганизмов гетерологичных и гомологичных родов и видов. Положительные реакции наблюдали только с гомологичными культурами. Перекрестных реакций с гетерологичными культурами при проверке специфичности диагностикумов выявлено не было.

В РЛА с разведениями чистых культур микроорганизмов гомологичных видов в концентрации от 10^9 до 10^4 м.к./см³ оценивали чувствительность диагностических препаратов. Одновременно ставили необходимые контрольные реакции. Чувствительность диагностических препаратов составляла 10^6 м.к./см³ при отрицательных результатах контрольных реакций.

Срок хранения диагностикумов по показателю первоначальной активности составлял 6-7 месяцев.

С помощью полученных методом «активированных эфиров» диагностикумов проводили изучение возможности индикации бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах, объектах внешней среды и кормах.

Возможность индикации бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах, объектах внешней среды и кормах с помощью полученных диагностических тест-систем на основе полистирольных полимерных носителей с карбоксильными функциональными группами определяли в РЛА как в опытах с искусственно контаминированными образцами, так и с нативным материалом. С этой целью были исследованы 50 смывов с инвентаря и оборудования птицефабрики (из них смывы №№1 - 10 были сделаны с инструмента на этапе нутровки; смывы №№11 - 20 – с

конвейера нутровки; смывы №№21 - 30 – с подвесок для птицы; смывы №№31 - 40 – с транспортера для тушек; смывы №№41 - 50 – с лотков (стол сортировки) , 50 проб помета птицы, 50 проб кормов для животных и 7 проб пищевых продуктов (мясо и мясопродукты, молочные продукты, яйца, крупы). Параллельно указанные образцы исследовали с помощью бактериологического метода. Результаты, полученные в РЛА, приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты РЛА, полученные при исследовании
проб с объектов птицефабрики

№	объект исследования	количество положительных реакций		
		поливалентный диагностический	диагностику м к группе В	диагностику м к группе D
I. СМЫВЫ С ИНВЕНТАРЯ И ОБОРУДОВАНИЯ ПТИЦЕФАБРИКИ				
1-10	смывы с инструмента на этапе нутровки	1	-	1
11-20	смывы с конвейера нутровки	5	1	3
21-30	Смывы с подвесок для птицы	1	-	1
31-40	смывы с транспортера для тушек	3	1	1
41-50	смывы с лотков (стол сортировки)	-	-	-
II. ПРОБЫ ПОМЕТА ПТИЦЫ				
1-25	птичник № 1	4	-	3
26-35	птичник № 2	2	-	1
36-50	птичник № 3	2	1	1
III. ПРОБЫ КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ				
1-30	пробы кормов для птицы	3	-	2
31-50	пробы кормов для непродуктивных животных	-	-	-

Результаты бактериологических исследований полностью совпали с результатами РЛА. Кроме того, бактериологическим методом были

выявлены сальмонеллы, относящиеся группе С (*S. infantis*). Однако, вследствие отсутствия диагностикумов на основе ПМ к антигенам сальмонелл группы С, положительные реакции в указанных случаях наблюдали только с поливалентным диагностикумом.

Чувствительность метода оценивали в опытах с искусственно контаминированными образцами пищевых продуктов и кормов. Для этого в образцы мяса, колбас, сыра, яиц, корма массой 25-50 г вносили 17-18-часовые культуры сальмонелл (*S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. typhimurium*) в количестве 1000, 100 и 20 м.к. Искомые бактерии выявляли в РЛА со смешанными культурами, полученными в среде обогащения в результате 6, 8 и 16-часового инкубирования при 37°C.

Сальмонеллы в образцах, контаминированных бактериями в количестве 1000 м.к. на 25г, выявляли в РЛА спустя 6 часов инкубации. Пробы, содержащие первоначально 100 и 20 м.к., положительно реагировали с диагностикумами спустя 16 часов инкубирования.

Во всех случаях положительный результат РЛА соответствовал внесенной культуре микроорганизмов.

В процессе исследований была создана тест-система для индикации бактерий рода *Salmonella*, которая включала: антительный диагностикум на основе полимерных микросфер, физиологический раствор, предметные стекла и бактериологические петли.

Проведенные исследования на модельных системах с бактериями рода *Salmonella* показали возможность использования разработанной тест-системы для индикации сальмонелл в объектах ветеринарно-санитарного и экологического контроля.

При проведении мониторинговых исследований указанных объектов с помощью разработанной тест-системы только в отдельных

случаях были выявлены искомые микроорганизмы. Результаты анализа на основе РЛА коррелировали с микробиологическими методами.

Экспрессность, экономичность метода и тест-систем на основе РЛА дает основание для рекомендации данного подхода для индикации бактерий рода *Salmonella*.

Технология получения сальмонеллезных латексных диагностикумов может быть использована при создании латексных диагностикумов для индикации сальмонелл.

Список использованной литературы:

1. Ajello G.W., Bolan G.A., Hayes P.S. et al.,-Commercial Latex Agglutination Tests for Detection of Haemophilus Influenzae Type B and Streptococcus Pneumonia Antigens in Patients with Bacteremic Pneumonia.// J. Clin. Microbiol.,-1987,-V.25,-N8,-pp. 1388-1391.
2. Hodfield S. G., Lane A. – A Novel Coloured Latex Test for the Detection and Identification of More Than One Antigen.// J. Immunol. Methods, - 1987, - V.97,- p. 153.
3. Jesudason M.V., Sridharan G., Mukundan S., John T.J. – VI-Specific Latex Agglutination for Early and Rapid Detection of Salmonella Serotype Typhi in Blood Cultures,- Diagnostic Microbiology and Infections Disease,- 1994, - Vol.18, - Iss.2, - pp. 75-78.
4. Sam W. C. – Latex Agglutination Assay for Detection of Cholera Toxin and Escherichia coli Heat-Labile Toxin.// J. Clin. Microbiol.,- 1992,- V.30,- N9,- pp.2518-2520.
5. Shumacher-Perdreau F., Peters G. – Commercial Latex Slide-Agglutination Test for Rapid Detection of Staphylococcus aureus.// Eur. J. Clin. Microbiol.,- 1987,- V.6, - N2, - pp. 215-216.