

УДК 619:614.3-078

UDC 619:614.3-078

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА И ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА
SALMONELLA НА ОСНОВЕ ЛАТЕКС-
АГГЛЮТИНАЦИИ****DEVELOPMENT OF A METHOD AND TEST -
SYSTEM DETECTION SALMONELLA 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*

В медицинской практике РЛА в качестве сигнального экспресс-теста для выявления антигенов микроорганизмов удобна при использовании в диагностических лабораториях, а также при проведении массовых обследований. К преимуществам РЛА, как метода серологической диагностики бактериальных и вирусных инфекций, можно отнести следующие моменты: высокую специфичность и чувствительность; отсутствие необходимости в сложной аппаратуре для постановки и реакции и регистрации результатов; сведение до минимума количества компонентов реакции; возможность получения инертных носителей с заданными характеристиками; возможность получения инертных носителей с заданными характеристиками

In medical practice, RLA as the alarm express train - test for revealing antigenes of microorganisms is convenient at use in diagnostic laboratories, and also at carrying out of mass inspections. To advantages of RLA, as a method of serologic diagnostics of bacterial and virus infections, it is possible to attribute the following moments: high specificity and sensitivity; absence of necessity for the complex equipment for statement and reactions and registration of results; data up to a minimum of quantity of components of reaction; an opportunity of reception of inert carriers with the set characteristics; an opportunity of reception of inert carriers with the set characteristics

Ключевые слова: РЕАКЦИЯ ЛАТЕКС-
АГГЛЮТИНАЦИИ, СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ, АНТИГЕНЫ, АНТИТЕЛА

Keywords: REACTION OF LATEX -
AGGLUTINATION, SEROLOGIC RESEARCHES,
ANTIGENES, ANTIBODIES

Впервые метод реакции латекс-агглютинации (РЛА) был предложен в 1956 году и использован для определения ревматоидного фактора с помощью полистирольных латексных микросфер с узким распределением частиц по размеру, покрытых гамма-глобулином человека. Сообщалось, что взаимодействие антигенов, находящихся в сыворотке крови пациента, с гамма-глобулином, адсорбированным на поверхности гидрофобных микросфер суспензии, привело к агглютинации полимерных частиц и образованию крупных агломератов, легко различимых невооруженным глазом. В последующие годы метод РЛА получил широкое распространение, как в клинических диагностических тестах, так и в биохимических и иммунологических исследованиях. Особенно широкое

применение РЛА наблюдается в инфекционной патологии (1, 2). В реакции латекс-агглютинации в качестве антигенного или антительного диагностикума используют монодисперсные суспензии сенсibilизированных полимерных микросфер (ПМ). Обычно, иммунологически активный компонент адсорбируется на полимерных частицах за счет физического взаимодействия между молекулами антигенов (или антител) и поверхностью частиц, но может быть использовано и ковалентное связывание через соответствующие активные группы. Вследствие того, что и антиген и антитело могут одновременно взаимодействовать с несколькими молекулами, образуются пространственные сетки, узлами которых служат молекулы антигена. Сенсibilизированные ПМ в присутствии гомологичного иммунореагента образуют агглютинат, хорошо видимый невооруженным глазом (3).

В нашей стране и за рубежом в настоящее время существуют коммерческие диагностикумы для РЛА, предназначенные как для идентификации и типирования микроорганизмов, выделенных из исследуемых образцов, так и для определения растворимых антигенов в биологических жидкостях. Диагностические препараты, созданные на основе полимерных микросфер (ПМ) с узким распределением частиц по размерам, находят широкое применение с целью обнаружения малого количества антител или антигенов в различных субстратах (1).

Объектами исследования РЛА могут быть сыворотка крови, слюна, молозиво, моча, фекалии и др., то есть все доступные объекты, содержащие антигены (или антитела).

Наиболее часто для получения диагностических препаратов используют полистирольные ПМ, несущие на своей поверхности различные функциональные группы (карбоксильные, эпоксидные, альдегидные и др.) и полиакролеиновые ПМ, содержащие на своей поверхности альдегидные функциональные группы, способные вступать в

реакцию с первичными аминогруппами, образуя основание Шиффа. Однако, описана возможность использования полимерных суспензий, синтезированных на основе ряда других мономеров (1, 2, 6).

Многими исследователями отмечается высокая чувствительность РЛА. Имеются сообщения об успешном использовании латексных диагностикумов при выявлении антигенов пневмококка, гемофильной палочки и менингококка непосредственно в биологических жидкостях, выявлении стрептококков, антигенов вируса краснухи, ротавирусов, антигенов *Clostridium difficile* в фекалиях, ревматоидного фактора, антигенов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, при диагностике адено- и герпесвирусных инфекций, холеры, а также для диагностики паразитарных болезней (2).

Для индикации растворимых полисахаридов пневмококка и гемофильной палочки в крови и моче пациентов, применяли коммерческие латексные диагностикумы Directigen и Vactigen. При этом специфичность диагностикумов составляла 97%, чувствительность – 92% (1, 4).

РЛА находит все более широкое применение и для диагностики вирусных заболеваний.

Таким образом, применение инертных синтетических носителей для иммобилизации антител (или антигенов) является широко распространенным методическим подходом в иммуноанализе. Как отмечается авторами, при тщательной отработке методики получения латексных диагностикумов, соблюдении оптимальных условий их приготовления и постановки самой реакции, РЛА может приближаться к самым современным иммунологическим методам. Отмечается высокая активность и специфичность диагностикумов – перекрестные реакции, по опубликованным данным, составляют не более 1-3% (1, 2).

Постановку РЛА осуществляют на чистой обезжиренной стеклянной пластинке по следующему методу: к капле исследуемого материала (10-50

мкл) добавляют каплю латексного диагностикума (в таком же объеме) и перемешивают. В присутствии гомологичного иммунореагента происходит агглютинация. При отрицательном результате реакции суспензия остается гомогенно мутной, без глыбок агглютината и участков просветления. Обычно, реакция происходит очень быстро – в течение 2-5 минут. Появление агглютинации позднее, чем через 10 минут после постановки РЛА, оценивают как неспецифический результат. При постановке РЛА параллельно ставят контрольные реакции, позволяющие исключить возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

РЛА в качестве сигнального экспресс-теста для выявления антигенов микроорганизмов удобна при использовании в практических лабораториях, а также при проведении массовых обследований. К преимуществам РЛА, как метода серологической диагностики бактериальных и вирусных инфекций, можно отнести следующие моменты:

- высокую специфичность и чувствительность;
- отсутствие необходимости в сложной аппаратуре для постановки и реакции и регистрации результатов;
- сведение до минимума количества компонентов реакции;
- возможность получения инертных носителей с заданными характеристиками.

Нами разработана диагностическая тест-система на основе латекс-агглютинации. Разработку способа проводили на модельной системе бактерий рода *Salmonella*. Схема индикации бактерий в объектах внешней среды, пищевых продуктах и кормах представлена на рис. 1.

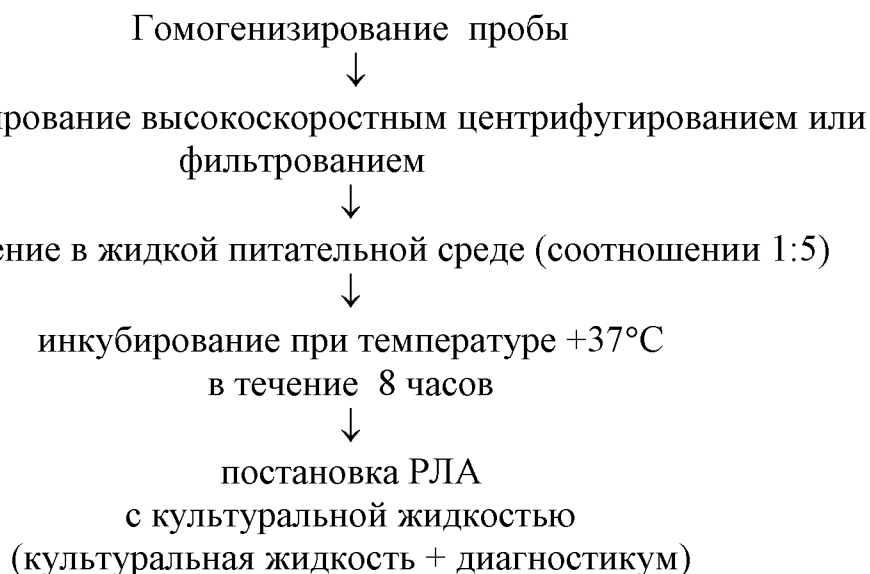


Рис. 1. Схема индикации бактерий с помощью РЛА

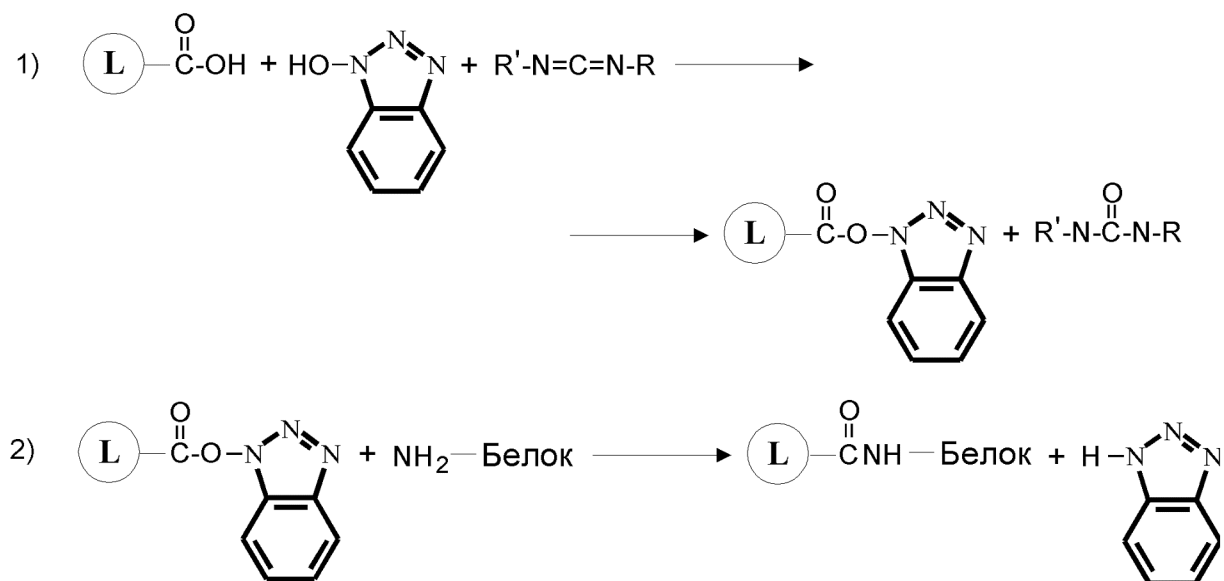
Результатом разработки явилась тест-система для индикации сальмонелл.

При получении высокочувствительных диагностических тест-систем методы активации должны удовлетворять следующим требованиям:

- проходить необратимо и по возможности в более мягких условиях;
- не снижать стабильность суспензий и не оказывать заметного влияния на диаметр полимерных частиц и распределение их по размерам;
- не влиять на биохимическую активность иммунологических компонентов, ковалентно связанных с функциональными группами на поверхности частиц суспензии.

Всем перечисленным требованиям соответствуют диагностикумы на основе полимерных носителей, полученные путем использования двухстадийных методов активации: на первой стадии карбоксильные группы переводят в активную (но стабильную) форму и микросферы отделяются от дисперсионной среды с оставшимися в ней

непрореагировавшими веществами, а на второй стадии проводят ковалентное связывание носителя с антителами. Схема протекания процесса активации в этом случае выглядит следующим образом:



После первой стадии проводили очистку суспензии от побочных продуктов. Вторая стадия включает инкубирование активированных полимерных носителей с иммуноглобулинами при периодическом перемешивании и протекает при температуре +4°C в течение суток, после чего проводят полную очистку полученного диагностикума от примесей.

Для проведения активации карбоксильных групп с помощью метода «активированных эфиров» использовали в качестве активирующего агента гидроксисукцинимид, а в качестве сшивающего агента – водорастворимый карбодиимид. Испытывали различные соотношения концентраций гидроксисукцинимида и водорастворимого карбодиимида. Активацию проводили в течение 20 минут при температуре +4°C и постоянном перемешивании.

Очистку активированной таким образом ПС от непрореагировавших веществ осуществляли центрифугированием. Осадок суспендировали в забуференном физиологическом растворе (рН 8,0 – 8,2) до концентрации

2% и обрабатывали в течение 5 минут в УЗ-диспергаторе. К 2%-ной ПС добавляли при постоянном перемешивании раствор иммуноглобулинов и оставляли сенсibilизироваться в течение 2,5 часов при температуре +20°C на встряхивателе, а затем еще на 22-24 часа при температуре +4°C. После завершения процесса сенсibilизации к ПС добавляли 0,5мл 0,5 М раствора глицина для блокады свободных функциональных групп и инкубировали в течение 30 минут при температуре +20°C. На заключительном этапе проводили окончательную очистку диагностикума от посторонних примесей и доводили концентрацию суспензии до 2%.

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.

Концентрация иммуноглобулинов, обеспечивающая оптимальную чувствительность диагностикума, составляла 95-97 мкг/мл.

Проверку специфичности полученных препаратов проводили в РЛА с культурами микроорганизмов гетерологичных и гомологичных родов и видов. Результаты РЛА приведены в таблице 1.

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./мл оценивали чувствительность диагностических препаратов. Одновременно ставили необходимые контрольные реакции. Чувствительность диагностических препаратов составляла 10^6 м.к./мл при отрицательных результатах контрольных реакций.

Таблица 1.

Специфичность сальмонеллезных диагностикумов (созданных на основе полистирольных ПН с карбоксильными функциональными группами)

Разведения культур микроорганизмов (10^9 м. к./мл)	Контроль (физ. р-р)	Контрольный препарат	1*	2**	3***
1. <i>Proteus mirabilis</i> 45a	-	-	-	-	-
2. <i>Proteus mirabilis</i> 342	-	-	-	-	-
3. <i>Proteus vulgaris</i> 55a	-	-	-	-	-
4. <i>Proteus vulgaris</i> 85/98	-	-	-	-	-
5. <i>Escherichia coli</i> K 88	-	-	-	-	-
6. <i>Escherichia coli</i> F 41	-	-	-	-	-
7. <i>Escherichia coli</i> 0139	-	-	-	-	-
8. <i>Escherichia coli</i> E 76	-	-	-	-	-
9. <i>Escherichia coli</i> 0142	-	-	-	-	-
10. <i>Escherichia coli</i> 0119	-	-	-	-	-
11. <i>Morganella morganii</i> 01	-	-	-	-	-
12. <i>Morganella morganii</i> 0331	-	-	-	-	-
13. <i>Morganella morganii</i> 045	-	-	-	-	-
14. <i>Klebsiella pneumoniae</i> K 53	-	-	-	-	-
15. <i>Klebsiella pneumoniae</i> K 72	-	-	-	-	-
16. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 265	-	-	-	-	-
17. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 4463	-	-	-	-	-
18. <i>Providencia rettgeri</i> 17 b	-	-	-	-	-
19. <i>Providencia rettgeri</i> 102 q	-	-	-	-	-
20. <i>Providencia rettgeri</i> 95 b	-	-	-	-	-
21. <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> II	-	-	-	-	-
22. <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> III	-	-	-	-	-
23. <i>Yersinia enterocolitica</i> O3	-	-	-	-	-
24. <i>Yersinia enterocolitica</i> O9	-	-	-	-	-
25. <i>Citrobacter freundii</i> 3/65	-	-	-	-	-
26. <i>Citrobacter freundii</i> 3/81	-	-	-	-	-
27. <i>Citrobacter freundii</i> 198	-	-	-	-	-
28. <i>Citrobacter diversus</i>	-	-	-	-	-
29. <i>Salmonella london</i>	-	-	+	-	-
30. <i>Salmonella infantis</i>	-	-	+	-	-
31. <i>Salmonella dublin</i>	-	-	+	+	-
32. <i>Salmonella anatum</i>	-	-	+	-	-
33. <i>Salmonella gallinarum</i> (pullorum)	-	-	+	+	-
34. <i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	+	+	-
35. <i>Salmonella virchow</i>	-	-	+	-	-
36. <i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-	+	-	-
37. <i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	+	-	+

«+» - положительный результат реакции

«-» - отрицательный результат реакции

1* - поливалентный сальмонеллезный диагностикум

2** - монорецепторный сальмонеллезный диагностикум к группе D

3*** - монорецепторный сальмонеллезный диагностикум к группе B

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

Экспрессность, экономичность метода и тест-систем на основе РЛА дает основание для рекомендации данного подхода для индикации сальмонелл.

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

Список использованной литературы:

1. Camargos P.A.M., Almeida M.S., Cardoso I.,- Latex Particle Agglutination –Test in the Diagnosis of Haemophilus-Influenzae Type B, Streptococcus-Pneumoniae and Neisseria-Meningitidis-A and Neisseria-Meningitidis-C Meningitidis in Infants and Children.//J.Clin. Epidemiol., -1995, - Vol. 48, - Iss.10,- pp. 1245-1250
2. Gualano M.P., Grundy M.A., Coacley W.T., - Ultrasound- Enhanced Latex Agglutination of Bacteria Antigen in Urine.// British Journal of Biomedical Science, - Vol. 52, - Iss. 3, - pp.178-183.
3. Воробьев А.А., Быков А.С. /Микробиология// М., Медицина.- 1994.
4. Донченко Л.В., Надыкта В.Д. /Безопасность пищевой продукции// М., Пищепромиздат.- 2001.
5. Лабораторная диагностика острых отравлений// Под ред. Рукозенкова Э.Д. М., Воениздат.- 1983.
6. Основы аналитической химии// В 2 кн. Кн. 1.- Общие вопросы. Методы разделения. Кн.2. Методы химического анализа Учеб. для вузов. / Золотов Ю.А., Дорохова Я.Н., Фадеева и др. Под ред. Золотова Ю.А.. М., Высш. шк.- 1996.- Кн.1 – 383 с.-Кн.2 - 461с.