

УДК 637:616.98:579.869.1

UDC 637:616.98:579.869.1

**КОНТРОЛЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ
КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ОСНОВЕ
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО
МЕТОДА**

**CONTROL OF ACTIVATORS OF SHARP
INTESTINAL INFECTIONS ON THE BASIS OF
METHOD OF IMMUNOCHROMATOGRAPHY**

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
*All-Russia Scientific research institute of veterinary
sanitary, hygiene and ecology, The Russian academy
of agricultural sciences, Moscow, Russia*

Показана возможность выявления сальмонелл группы В иммунохроматографическим методом в пищевых продуктах, воде и воздухе

The opportunity of revealing of salmonellas of group В with immunochromatography method in foodstuff, water and air is shown

Ключевые слова: ЭКСПРЕСС-ИНДИКАЦИИ, ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ, ИНДИКАЦИЯ

Keywords: EXPRESS-INDICATIONS, IMMUNOCHROMATOGRAPHY ANALYSIS, ACTIVATORS OF VIRUS AND BACTERIAL NATURE, INDICATION

В настоящее время большой интерес представляет разработка и внедрение в практику систем экспресс-индикации возбудителей острых кишечных инфекций вирусной и бактериальной природы, использование которых возможно как в лабораторных, так и в полевых условиях. Задачей при создании таких систем является как можно более раннее выявление возбудителя заболевания в кратчайшие сроки при упрощении процедуры анализа. Перспективной с этой точки зрения являются методы на основе иммунохроматографии (1).

Метод иммунохроматографического анализа основан на течении иммунной реакции «антиген-антитело» при движении тестируемого жидкого образца по композитной мембране и визуальном учете результатов по наличию или отсутствию окрашенных зон с иммобилизованными иммунореагентами.

Иммунохроматографические индикаторные элементы (ИИХЭ) представляют собой сборку из нескольких мембран, плотно прилегающих друг к другу и обеспечивающих свободное перемещение жидкой пробы под действием капиллярных сил от подложки для нанесения исследуемого

образца к подложке для впитывания образца. Принцип достижения аналитического эффекта заключался в следующем. Жидкую пробу, содержащую микроорганизмы, наносили на подложку для впитывания образца, затем пробу перемещали вдоль сборки мембран, реагируя с антителами, конъюгированными с коллоидным золотом. Образованный комплекс имел вишневую окраску. Полученный иммунный комплекс под действием капиллярных сил перемещался по нитроцеллюлозной мембране, достигает аналитической зоны, где происходила его иммобилизация на мембране за счет связывания с антителами аналитической зоны. В этой зоне образовывался ярко-окрашенный «сэндвич» конъюгата коллоидного золота, связанного с микробными клетками, и антител, иммобилизованных на мембране. В аналитической зоне наносили антитела к другим антигенным эпитопам инфекционного агента. Часть жидкой пробы продолжала перемещение по нитроцеллюлозной мембране, связываясь с антителами контрольной зоны и впитываясь в ложку для сбора образца. Образование окраски в контрольной зоне подтверждает наличие связанных с золотом антител, косвенно указывая на иммунохимическую активность конъюгата.

Неоценимое значение такие тест-системы имеют при решении широкого диапазона вопросов эпизоотического и эпидемического надзора, в том числе таких актуальных проблем, как надзор за кишечными инфекциями.

Цель работы

Адаптация методов иммунохроматографического определения возбудителей острых кишечных инфекций, в частности, бактерий рода *Salmonella* (группа В) в объектах окружающей среды, кормах и продуктах питания.

Материалы и методы

Исследовали пробы продовольственного сырья, пищевых продуктов, кормов для животных и объектов окружающей среды.

Индикацию бактерий рода *Salmonella* группы В проводили в 743 объектах окружающей среды, 51 образце кормов для животных и 175 образцов пищевых продуктов, 200 образцов продовольственного сырья.

Для выявления бактерий рода *Salmonella* с помощью иммунохроматографических тест-систем использовали «Набор ИИХЭ для индикации сальмонелл».

Подтверждение результатов, полученных при иммунохроматографических исследованиях, проводили бактериологическим методом. Отбор и подготовку проб пищевых продуктов для исследований бактериологическим методом проводили в соответствии с НД на данный вид продукции. Исследования проводили в соответствии ГОСТ на определенный вид пищевых продуктов и кормов.

Исследования проводили как с искусственно контаминированными пробами, так и с нативными образцами, с одновременной постановкой необходимых контролей.

Для искусственной контаминации образцов пищевых продуктов, объектов окружающей среды, кормов использовали десятикратные разведения культур микроорганизмов в концентрации от 10^6 до 10 м.к./мл.

При исследовании проб воздуха для концентрирования использовали импакторы (происходит принудительное осаждение микроорганизмов из прокачиваемого через прибор воздуха на плотные питательные среды) и импинджеры (микроорганизмы концентрируются при барбатации через стерильный физиологический раствор).

При использовании импакторов микроорганизмы смывали с поверхности плотных питательных сред стерильным физиологическим раствором, центрифугировали, осадок ресуспендировали в буфере для проведения иммунохроматографического анализа.

При использовании импинджеров со стерильным физиологическим раствором, концентрирование микроорганизмов проводили высокоскоростным центрифугированием с последующим ресуспендированием осадка в буфере для проведения иммунохроматографического анализа.

Дальнейшие исследования проводили с помощью ИИХЭ, непосредственно исследуя сконцентрированные микроорганизмы (экспресс-анализ), а также проводили обогащение материала в соответствующих питательных средах для повышения чувствительности иммунохроматографического метода.

Пробы почвы отбирали в стерильные колбы. Из общей пробы отбирали навеску для исследований массой (25 ± 1) г, разводили 1:5 – 1:9 стерильным физиологическим раствором, фильтровали через бумажный фильтр. Надосадочную жидкость использовали для дальнейших исследований. Для концентрирования микроорганизмов использовали высокоскоростное центрифугирование или фильтрацию через мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм. Осадок ресуспендировали в буфере для проведения иммунохроматографического анализа, встряхивая на вортексе. Затем исследования проводили с помощью ИИХЭ, непосредственно исследуя сконцентрированные микроорганизмы (экспресс-анализ), а также проводили обогащение материала в соответствующих питательных средах.

При исследовании воды в стерильную колбу, отбирали не менее 500 мл пробы (две параллельные пробы) и фильтровали с помощью вакуумной установки через мембранные фильтры («Millipore») с диаметром пор 0,45 мкм. При исследовании воды из открытых водоемов в случае присутствия в образце значительного количества механических примесей, пробу предварительно фильтровали через бумажный фильтр. Для исследований использовали 2 фильтра. Далее проводили элюирование осадка с первого

фильтра, помещая фильтр в стерильный физиологический раствор в объеме 5 мл (при дальнейшем исследовании ИИХЭ). Второй фильтр использовали для дальнейших исследований методом ИИХЭ после обогащения в соответствующей питательной среде. Для проведения процедуры обогащения использовали мясо-пептонный бульон или сердечно-мозговой бульон. Исследуемые образцы инкубировали при температуре 37°C в течение 6- 12 часов.

Смывы с объектов брали с поверхности, размером 10x10 см стерильным тампоном, закрепленном на зонде, смоченном стерильным физиологическим раствором. Отобранную тампоном пробу быстро вносили в пробирку, не доводя до дна 5 мм. Обламывали конец ручки тампона и закрывали крышкой.

При исследовании образцов продовольственного сырья и пищевых продуктов твердые образцы измельчали в гомогенизаторе.

Для проведения экспресс-анализа без обогащения, образцы после гомогенизирования в физиологическом растворе, подвергали низкоскоростному центрифугированию, отбирали надосадочную жидкость, центрифугировали высокоскоростным центрифугированием, осадок ресуспендировали в 300 мкл физиологического раствора. Затем, добавляли 300 мкл буфера для проведения иммунохроматографических исследований. Переносили 120-150 мкл этого раствора по каплям в лунку для внесения образца на иммунохроматографический индикаторный элемент, согласно инструкции по применению ИИХЭ.

При проведении анализа с процедурой обогащения проводили следующую процедуру пробоподготовки.

Из общей пробы отбирают навеску анализируемого образца массой $(25 \pm 0,1)$ г или объемом $(25 \pm 0,1)$ мл для исследований.

Навеску анализируемого образца массой $(25 \pm 0,1)$ г или объемом $(25 \pm 0,1)$ мл вносили в стерильную колбу и добавляли 225 мл одной из

следующих питательных сред: трипказо-соевый бульон, сердечно-мозговой бульон, забуференная пептонная вода. При необходимости анализа других масс (объемов) образца, проводили их посев в перечисленные жидкие питательные среды, в соотношении 1:9 по объему. рН поддерживали в диапазоне $\approx 7,2 - 7,6$. С целью выравнивания рН питательных сред использовали 0,1 М фосфатно-солевой буферный раствор.

Образцы масла сливочного расплавляли на водяной бане при температуре 35°C - 40°C.

Образцы кондитерских изделий с шоколадом после стадии гомогенизации подвергали фильтрованию через бумажный фильтр до получения прозрачного анализата.

Исследования молочных продуктов (молоко, кисломолочные продукты) не проводили.

Инкубировали пробы в термостате при температуре 37°C в течение 6-12 часов при постоянном перемешивании. Из жидкой питательной среды на различных этапах инкубирования (через 6 и 12 часов) отбирали по 2 мл жидкой фракции, подвергали высокоскоростному центрифугированию, осадок ресуспендировали в 300 мкл физиологического раствора. Экспериментальным путем установлено, что оптимальное время инкубирования при проведении этапа обогащения составляло 12 часов при температуре 37°C. Затем, добавляли 300 мкл буфера для проведения иммунохроматографических исследований. Переносили 120-150 мкл этого раствора по каплям в лунку для внесения образца на иммунохроматографический индикаторный элемент, согласно инструкции по применению ИИХЭ.

Образцы исследовали на месте или отправляли в лабораторию. Транспортирование образцов к месту проведения исследований осуществляли в как можно более сжатые сроки в термоизолирующих

плотно закрывающихся контейнерах, приспособленных для транспортирования биологического материала. В лабораторных условиях отобранные образцы извлекали и подготавливали для дальнейших исследований.

Подготовка проб для исследований и проведение исследований представлена на схеме (рисунок 1).



Рис. 1. Схема индикации микроорганизмов с помощью иммунохроматографии

Объем пробы, необходимой для анализа с помощью ИИХЭ составлял 100-150 мкл. На пластину ИИХЭ в окошко для внесения пробы по каплям (20 мкл) вносили исследуемый аналит. Время экспозиции составляло 20-30 мин.

Результаты исследований оценивали визуально по наличию 2-х окрашенных полос на мембране ИИХЭ. Четкое появление двух окрашенных полос указывает на наличие в пробе искомым микроорганизмов.

Полученные результаты показывают, что чувствительность аналитических систем на основе иммунохроматографии с использованием коллоидного золота составляла $10^5 \dots 1 \times 10^6$ м.к./мл. Объем пробы для анализа с помощью ИИХЭ не превышал 100-150 мкл, а время 20-30 мин. Таким образом, $10^5 \dots 1 \times 10^6$ микробных клеток нанесенных на ИИХЭ приводил к аналитическому эффекту.

При отсутствии в пробе определяемого антигена меченые антитела доходят до участка полоски с иммобилизованным антигеном. Далее иммунный комплекс продвигается до участка полоски с иммобилизованными антивидовыми антителами. На этом месте начнет формироваться антивидовой иммунный комплекс, который приведет к образованию окрашенной контрольной зоны. Окраска в контрольной зоне должна образовываться всегда и служить контролем сохранности тест-полоски для использования. Отсутствие окраски в контрольной зоне свидетельствует о том, что иммунореагенты на тест-полоске неактивны и, следовательно, результаты анализа оценить нельзя.

При проведении исследований на модельных системах различных микроорганизмов положительная реакция наблюдалась только в гомологичных системах. Перекрестных реакций с гетерологичными бактериями, включая близкородственные виды, не наблюдалось.

Результаты изучения специфичности иммунохроматографического метода представлены в таблице 1.

Результаты исследований, полученные иммунохроматографическим методом, были специфичны с гомологичными и гетерологичными культурами микроорганизмов.

Таблица 1.

Изучение специфичности иммунохроматографического метода при исследовании объектов внешней среды

	Наименования культур микроорганизмов (10 ⁵ м. к./мл)	ИИХЭ на сальмонеллы группы В
1	<i>Escherichia coli</i> НВ 101	-
2	<i>Escherichia coli</i> штамм К88	-
3	<i>Escherichia coli</i> штамм 0139	-
4	<i>Salmonella thyphimurium</i> (В)	+
5	<i>Salmonella dublin</i> (D)	-
6	<i>Salmonella enteritidis</i> (D)	-
7	<i>Salmonella anatum</i>	-
8	<i>Klebsiella pneumonia</i> 53(4/53)	-
9	<i>Klebsiella pneumonia</i> 72(4/72)	-
10	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> II (12/2)	-
11	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> III (12/3)	-
12	<i>Yersinia enterocolitica</i> O3 (12/4)	-
13	<i>Yersinia enterocolitica</i> O9 (12/5)	-
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Н-1 (1/25)	-
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1 (1/32)	-
16	<i>Pseudomonas putida</i> 1301 (1/54)	-
17	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4125 (1/18)	-
18	<i>Proteus mirabilis</i> (0/6)	-
19	<i>Proteus vulgaris</i> (0/7)	-
20	<i>Morganella morganii</i> 01 (3/41)	-
21	<i>Morganella morganii</i> 045 (3/44)	-

«+» - положительный результат реакции

«-» - отрицательный результат реакции

Проверку чувствительности метода индикации с помощью ИИХЭ проводили с десятикратными разведениями культур микроорганизмов. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2.

**Результаты индикации сальмонелл группы В
при искусственной контаминации**

Наименование, микроорганизма	Концентрация, м.к./мл	Иммунохроматографический метод	
		без стадии обогащения	После обогащения (12 ч)
Исследование проб воздуха			
Salmonella thyphimuriun (группа В)	10 ⁹	+	+
	10 ⁸	+	+
	10 ⁷	+	+
	10 ⁶	+	+
	10 ⁵	+	+
	10 ⁴	-	+
	10 ³	-	+
	10 ²	-	+
10	-	+	
Исследование проб воды			
Salmonella thyphimuriun (группа В)	10 ⁹	+	+
	10 ⁸	+	+
	10 ⁷	+	+
	10 ⁶	+	+
	10 ⁵	+	+
	10 ⁴	-	+
	10 ³	-	+
	10 ²	-	+
10	-	+	
Исследование проб почвы			
Salmonella thyphimuriun (группа В)	10 ⁹	+	+
	10 ⁸	+	+
	10 ⁷	+	+
	10 ⁶	+	+
	10 ⁵	+	+
	10 ⁴	-	+
	10 ³	-	+
	10 ²	-	+
10	-		
Исследование смывов			
Salmonella thyphimuriun (группа В)	10 ⁹	+	+
	10 ⁸	+	+
	10 ⁷	+	+
	10 ⁶	+	+
	10 ⁵	+	+
	10 ⁴	-	+
	10 ³	-	+
	10 ²	-	+
10	-	+	

С помощью указанной методики, проводили мониторинговые исследования различных объектов на присутствие сальмонелл группы В. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3.
Результаты исследований объектов внешней среды
при анализе нативных образцов на наличие бактерий рода *Salmonella*

Наименование объекта исследований	Иммунохроматографический метод	
	без стадии обогащения	После обогащения (12 ч)
Исследование проб воздуха ¹	-	-
Исследование проб воды ²	-	-
Исследование проб почвы ³	-	-
Исследование смывов ⁴	-	5

¹ – всего исследовано 144 пробы воздуха

² – всего исследовано 205 проб воды

³ – всего исследовано 144 пробы почвы

⁴ – всего исследовано 250 смывов

Заключение

Проведена адаптация иммунохроматографических индикаторных элементов для выявления бактерий рода *Salmonella* группы В в объектах окружающей среды, продовольственном сырье, пищевых продуктах и кормах для животных. Разработаны схемы индикации бактерий в конкретных объектах. Полученные на основе проведенных исследований результаты позволяют рекомендовать данный метод для проведения экспресс-анализов как в лабораторных, так и в полевых условиях.

Список использованной литературы:

1. Ярков С.П., Третьяков С.И., Башарова Л.А., Злобин В.Н. Индикация возбудителей особо опасных заболеваний с помощью иммунохроматографии и видеоцифрового анализа.- Вестник Российской АМН.- № 12.- 2007.- С. 22-26.
2. Ярков С. П., Скопинская С. Н., Шиленко И. В., Злобин В. Н. /Люминесцентный иммунохроматографический анализ антигенов микроорганизмов// Вестник Российской Академии Медицинских Наук.-М.-2009.- №3.-С. 17-25.