

УДК 637:616.98:579.869.1

UDC 637:616.98:579.869.1

**УСКОРЕННЫЙ КОНТРОЛЬ МИКРОБНЫХ
КОНТАМИНАЦИЙ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ,
КОРМОВ И ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ
СРЕДЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ
ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА
«VIDAS»**

**ACCELERATED CONTROL MICROBE
CONTAMINATIONS OF FOOD PRODUCTS,
FORAGES AND OBJECTS OF THE
ENVIRONMENT WITH APPLICATION OF
"VIDAS" IMMUNOLOGICAL ANALYZER**

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*

Изучена возможность проведения ускоренной индикации микробных контаминаций пищевых продуктов, продовольственного сырья и кормов для животных с применением иммунологического многопараметрического анализатора «VIDAS»

The opportunity of carrying out the accelerated indication of microbe contaminations of food products, food raw material and forages for animals with application of "VIDAS" immunological multiple parameter analyzer is investigated

Ключевые слова: СЕЛЕКТИВНОЕ
ОБОГАЩЕНИЕ, ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ
РЕАКЦИЯ, ИЗМЕРЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Keywords: SELECTIVE ENRICHMENT, IMMUNE-
ENZYME REACTION, MEASUREMENT OF
INTENSITY OF FLUORESCENCE,
FLUORESCENT DEFINITION

В настоящее время для обнаружения возбудителей бактериальной природы широко используют различные методы иммунодиагностики, основанные на выявлении антител или антигенов в различных субстратах (1). Значительное внимание уделяется использованию в практических лабораториях сигнальных методов исследований, позволяющий выявлять соответствующие антигены в короткий срок с высокой степенью специфичности и чувствительности (2).

К категории таких методов относится иммунологический анализ с использованием многопараметрического иммунологического анализатора «Vidas». К достоинствам данного метода относятся: сокращение сроков проведения исследований, высокая чувствительность и специфичность полученных результатов, исключение риска перекрестной контаминации, так как все этапы анализа выполнялись автоматически в аналитическом модуле, а также возможность одновременного анализа значительного количества образцов.

Схема анализа включала селективное обогащение исследуемого образца, дозирование аликвоты обогащенного образца в стрипы и исследование с помощью автоматического анализатора «VIDAS».

Принцип метода состоит в том, что фиксированное на твердой фазе антитело захватывает искомый патоген. Второе антитело, меченное ферментом, формирует комплекс с фиксированным антигеном. Высокая специфичность анализа достигается использованием для сенсibilизации стрипов очищенных моноклональных антител к «О»-антигену. В лунки для внесения образца дозируется бульон дополнительного обогащения. В процессе дополнительного обогащения непосредственно в лунках стрипа происходит реактивация поврежденных клеток искомых микроорганизмов и дальнейший рост числа клеток. Далее происходит образование комплекса микроорганизмов с конъюгатом (сэндвич). Система измеряет интенсивность флуоресценции и интерпретирует результат.

Схема метода приведена на рисунках 1-2.

Фиксированное на твердой фазе антитело захватывает искомый патоген.

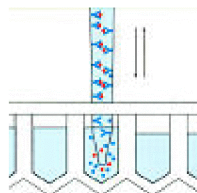


Рис. 1. Двухэтапная иммуноферментная реакция.

Второе антитело, меченное ферментом, формирует комплекс с фиксированным антигеном.

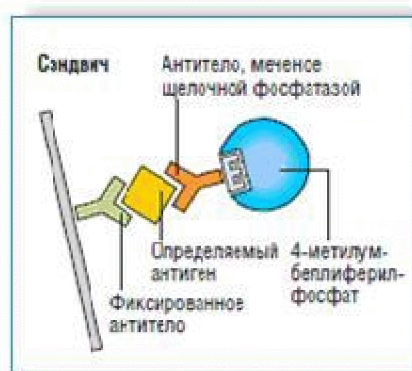


Рис. 2. Флуоресцентное определение

При проведении исследований осуществляли искусственную контаминацию образцов (продовольственного сырья, пищевых продуктов и кормов для животных). Кроме того проводили мониторинговые исследования. Для искусственной контаминации образцов использовали десятикратные разведения бактерий рода *Salmonella* (*Salmonella thyphi*, *Salmonella anatum*, *Salmonella enteritidis*). Разведения готовили по стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича. В контаминируемые образцы вносили по 1 мл разведений с концентрацией 10 м.к./мл.

Данные, полученные при искусственной контаминации образцов сырья (мясо птицы, говядина, свинина, баранина, рыба) и пищевых продуктов (мясные полуфабрикаты, молочные продукты, яйца) и кормов для животных (твердые полнорационные гранулированные корма для КРС, свиней, птицы), показали, что диагностикумы давали положительный результат только в гомологичных системах (диагностикум и контаминант одного и того же вида возбудителя). Перекрестных реакций не наблюдалось (таблицы 1-3.)

Таблица 1.

Результаты определения специфичности индикации бактерий рода *Salmonella* в искусственно контаминированных образцах продовольственного сырья

Культуры Микроорганизмов (10 м. к./мл)	Тест-системы «Vidas Salmonella»
<i>Salmonella thyphi</i> 1	+
<i>Salmonella anatum</i>	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+
<i>Klebsiella pneumonia</i> 53(4/53)	-
<i>Klebsiella pneumonia</i> 72(4/72)	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> II (12/2)	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> III (12/3)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O3 (12/4)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O9 (12/5)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H-1 (1/25)	-

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1 (1/32)	-
<i>Pseudomonas putida</i> 1301 (1/54)	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4125 (1/18)	-
<i>Proteus mirabilis</i> (0/6)	-
<i>Proteus vulgaris</i> (0/7)	-
<i>Morganella morganii</i> 01 (3/41)	-
<i>Morganella morganii</i> 045 (3/44)	-

“+” – положительный результат реакции

“-” - отрицательный результат реакции

Таблица 2.

Результаты определения специфичности индикации бактерий рода *Salmonella* в искусственно контаминированных образцах пищевых продуктов

Культуры Микроорганизмов (10 м. к./мл)	Тест-системы «Vidas Salmonella»
<i>Salmonella thyphi</i> 1	+
<i>Salmonella anatum</i>	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+
<i>Klebsiella pneumonia</i> 53(4/53)	-
<i>Klebsiella pneumonia</i> 72(4/72)	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> II (12/2)	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> III (12/3)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O3 (12/4)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O9 (12/5)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H-1 (1/25)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1 (1/32)	-
<i>Pseudomonas putida</i> 1301 (1/54)	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4125 (1/18)	-
<i>Proteus mirabilis</i> (0/6)	-
<i>Proteus vulgaris</i> (0/7)	-
<i>Morganella morganii</i> 01 (3/41)	-
<i>Morganella morganii</i> 045 (3/44)	-

“+” – положительный результат реакции

“-” - отрицательный результат реакции

Таблица 3.

Результаты определения специфичности индикации бактерий рода *Salmonella* в искусственно контаминированных образцах кормов для ЖИВОТНЫХ

Культуры Микроорганизмов (10 м. к./мл)	Тест-системы «Vidas Salmonella»
<i>Salmonella thyphi</i> 1	+
<i>Salmonella anatum</i>	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+
<i>Klebsiella pneumonia</i> 53(4/53)	-
<i>Klebsiella pneumonia</i> 72(4/72)	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> II (12/2)	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> III (12/3)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O3 (12/4)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O9 (12/5)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H-1 (1/25)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1 (1/32)	-
<i>Pseudomonas putida</i> 1301 (1/54)	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4125 (1/18)	-
<i>Proteus mirabilis</i> (0/6)	-
<i>Proteus vulgaris</i> (0/7)	-
<i>Morganella morganii</i> 01 (3/41)	-
<i>Morganella morganii</i> 045 (3/44)	-

“+” – положительный результат реакции

“-” - отрицательный результат реакции

Проверку чувствительности используемых методов индикации проводили в соответствующих реакциях с десятикратными разведениями в стерильном физиологическом растворе чистых культур гомологичных микроорганизмов: *Salmonella thyphi*, *Salmonella anatum*, *Salmonella enteritidis*, от 10^9 до 10^1 м.к./мл.

Чувствительность методов исследований при индикации возбудителей в образцах пищевых продуктов, сырья, кормов для животных и объектов окружающей среды позволяла выявлять единичные клетки при проведении этапа обогащения в течение 24 часов. Общее время анализа по данной схеме составляло 36 часов.

Проведение пищевых продуктов, продовольственного сырья, кормов для животных исследований с помощью метода иммунологического анализа позволяет получать достоверные результаты в течение 36. При этом не было ограничений при работе с какими-либо типами образцов.

Проведенные исследования показали, что методы и тест-системы иммунологического анализа позволяют с высокой степенью специфичности выявлять возбудителей острых кишечных инфекций в пищевых продуктах и кормах.

С использованием данного метода проведены мониторинговые исследования различных объектов ветеринарно-санитарного контроля на наличие бактерий рода *Salmonella*. Результаты мониторинговых исследований приведены на диаграмме 1.

Процент выявленных бактерий рода *Salmonella* в объектах ветеринарно-санитарного надзора

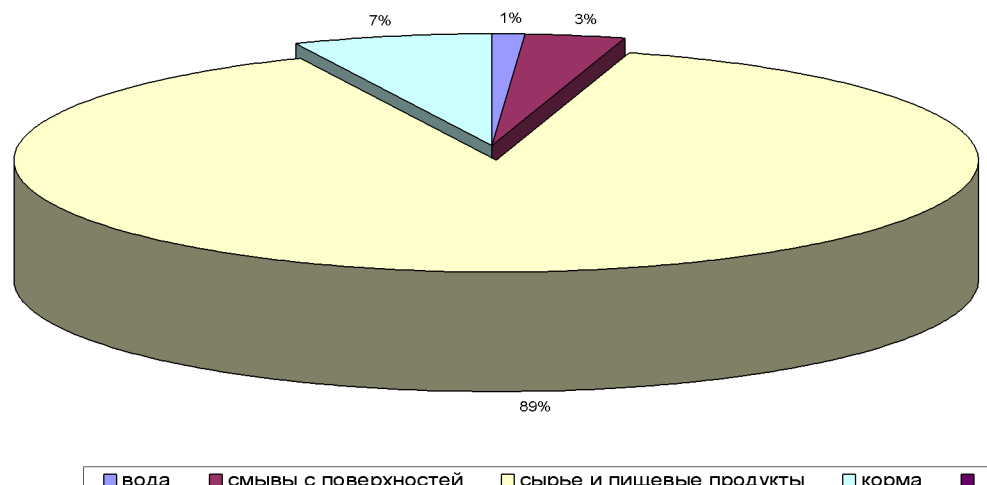


Диаграмма 1. Индикация бактерий рода *Salmonella* в объектах ветеринарно-санитарного надзора.

Полученные данные были подтверждены классическим бактериологическим анализом с последующей постановкой реакции

агглютинации с O-агглютинирующими сальмонеллезными сыворотками, а также идентификацией подозрительных колоний на приборе «VITEC2».

Список использованной литературы:

1. Munoz-Olivas R. «Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses». Trends Anal. Chem., 2 (3), 203-216, (2004).
2. Калашникова Т.В., Мусабаев Э.И., Ковтуненко Н.Г. и др./Разработка и внедрение управления качеством лабораторных исследований//Сборник трудов 6-ой Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика», М., 2007.- Том 1.- С.48-52.