

УДК 637.1/3

Экспресс-тесты Singlepath® и Duopath® для выявления патогенных микроорганизмов и токсинов в пищевых продуктах

Канд. биол. наук **Д.М.СОКОЛОВ**,
д-р биол. наук **М.С.СОКОЛОВ**
ООО «МикроБио»

Инфекционные заболевания во всем мире прочно занимают первое место в структуре заболеваемости населения. Среди них одна из лидирующих позиций принадлежит острым кишечным инфекциям (ОКИ). Тенденция роста ОКИ характерна для всех стран, включая и Россию. По официальным данным заболеваемость ОКИ в России за период 1999–2009 гг. выросла в 7 раз. В структуре вспышечной заболеваемости ведущее место принадлежит сальмонеллезу и кампилобактериозу. Постоянно растет заболеваемость шигеллезами и эшерихиозами. Среди эшерихиозов особое значение приобрел энтерогемморрагический колит с высокой летальностью, причиной которого являются *E. coli* O157 и некоторые другие серотипы кишечной палочки, способные продуцировать веротоксины.

Повышенная заболеваемость ОКИ в развивающихся странах связана с быстрым ростом и скученностью населения, низкими уровнями санитарной культуры, качества пищи и воды. В развитых странах основными причинами вспышек кишечных инфекций являются грубейшие нарушения технологического

процесса на предприятиях пищевой промышленности, а также в сфере водо-подготовки и водоотведения. Для снижения уровня заболеваемости ОКИ ключевое значение приобретает санитарно-микробиологический контроль воды, сырья и готовых продуктов питания на всех этапах производства и реализации.

Масштабность и динамичность современного производства пищевых продуктов и технологий водоочистки требуют эффективных методов санитарного контроля, позволяющих принимать своевременные решения. Культуральный бактериологический метод в своем классическом чашечном варианте все меньше соответствует требованиям современного производства из-за продолжительности и трудоемкости.

ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Основными современными методами экспресс-диагностики возбудителей являются иммунологические и молекулярные методы детекции. В основе молекулярных методов лежит амплификация короткого участка ДНК или РНК, уникального для целевого возбудителя. Этот участок-мишень распознается с помощью специфических олигонуклеотидных праймеров (затравок) и многократно копируется (амплифицируется) комплексом ферментов. Одним

из наиболее распространенных методов амплификации является полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Экспресс-методы, основанные на иммунологических реакциях, направлены на поиск в исследуемом материале специфических антигенов микроорганизмов (белков, гликопротеидов, липопротеидов, гликолипидов). Наиболее распространенным методом иммунодиагностики является иммуноферментный анализ (ИФА).

ПЦР и ИФА, обладая несомненными преимуществами, такими как относительная простота выполнения, быстрота и объективность (за счет автоматизации учета результатов), тем не менее имеют ряд недостатков, что не позволяет полностью заменить ими бактериологический метод. Следует отметить, что обнаружение антигенов или ДНК патогенных микроорганизмов в исследуемом материале не дает информации об их жизнеспособности, так как указанные соединения будут определяться и после гибели клеток. Кроме того, эти методы на несколько порядков уступают бактериологическому методу по чувствительности и не подходят для исследования образцов с низкими уровнями контаминации. Данные методы исследования требуют высокотехнологичного оборудования, комплекса помещений и высококвалифицированного персонала (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика методов определения возбудителей ОКИ

Параметры метода	Бактериологический метод	ПЦР	ИФА	ИХА	Singlepath® и Duopath®
Одноэтапное или двухэтапное обогащение в жидкой среде	24–48 ч	–	–	–	24–48 ч
Культивирование на плотных селективных средах	24–48 ч	–	–	–	–
Выполнение теста	–	4–6 ч	2–3 ч	Менее 1 ч	Менее 1 ч
<u>ИТОГО времени до выдачи отрицательного результата или предварительного положительного результата</u>	2–4 сут	4–6 ч	2–3 ч	Менее 1 ч	1–2 сут
Биохимическая идентификация (при необходимости)	3–4 сут	–	–	–	2 сут
<u>ИТОГО времени до выдачи подтвержденного положительного результата</u>	5–8 сут	4–6 ч	2–3 ч	Менее 1 ч	3–4 сут
Чувствительность метода	1 КОЕ в образце	10 ² –10 ³ КОЕ/мл	10 ² –10 ⁵ КОЕ/мл	10 ⁴ –10 ⁸ КОЕ/мл	1 КОЕ в образце
Трудоемкость метода	++++	++	++	+	++
Высокотехнологическое оборудование	–	+	+	–	–
Высокая квалификация исполнителя	+	+	+	–	–

ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ

Рациональное и простое решение предложила компания Merck KGaA (Германия), выпустив диагностические тест-системы Singlepath® и Duopath® для обнаружения патогенных микроорганизмов и токсинов (табл. 2). Эти тест-системы сочетают высокую чувствительность бактериологического метода с оперативностью и высокой специфичностью иммунологического метода, что позволяет ускорить классический бактериологический анализ без потерь чувствительности и оценки жизнеспособности.

Вначале исследуемый образец подвергается обогащению в селективной среде. Этот этап является элементом бактериологического метода. С одной стороны, он увеличивает количество искомых микроорганизмов до детектируемого уровня, а с другой – подтверждает жизнеспособность исследуемых клеток патогена, которые смогли размножиться в среде обогащения.

На втором этапе осуществляется индикация целевых микроорганизмов в обогащенной культуре при помощи иммунологической тест-системы. В ее основе лежит иммунохроматографический метод исследования, который давно уже получил широкое распространение в клинической практике.

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Иммунохроматографический анализ (ИХА) является разновидностью иммуноферментного метода с мечеными компонентами. В ИФА антитела к искомым антигенам метятся ферментом, а в ИХА – коллоидным золотом. Каждый из вариантов имеет свои преимущества.

Метка ферментом повышает чувствительность реакции за счет активности самого фермента, усиливающего индикацию положительного результата. Чувствительность ИФА находится в пределах 10^2 – 10^5 КОЕ/мл [4].

Недостатками такой системы являются необходимость инструментального учета результата при помощи специального планшетного фотоколориметра и более сложная методика выполнения, включающая приготовление растворов, внесение нескольких реагентов, многократные промывки и инкубацию в термостате [4]. ИХА обладает меньшей чувствительностью из-за неактивной метки (10^4 – 10^8 КОЕ/мл [5]), но при этом крайне прост в исполнении, а учет результата осуществляется визуально и не требует наличия сложных дорогих приборов и высокой квалификации исполнителя.

Иммунохроматографический тест Singlepath® (рис. 1) содержит полоску пористого материала, обеспечивающего распространение жидкости. В зоне внесения исследуемого материала (круглая



Рис. 1. Иммунохроматографический тест Singlepath® *Salmonella* для экспрессного определения сальмонелл. Слева – отрицательный ответ; справа – положительный ответ

Таблица 2

Перечень тест-систем Singlepath® и Duopath®

Тест-система	Определяемый объект	Питательные среды для бактериологического этапа исследования
Singlepath® <i>Salmonella</i>	Сальмонеллы	Забуференная пептонная вода Среда Раппапорт-Вассилиадиса Селенит-цистиновый или тетрациклиновый бульон
Singlepath® <i>Listeria mono</i> Singlepath® <i>Listeria</i> Singlepath® <i>E. coli</i> O157	<i>Listeria monocytogenes</i> Листерии <i>E. coli</i> O157	Среда UVM или среда Фразера Среда UVM или среда Фразера ЕС бульон с новобиоцином или триптиказо-соевый бульон с новобиоцином
Duopath® <i>Verotoxins</i>	Веротоксины энтеропатогенных <i>E. coli</i>	ЕС бульон с новобиоцином или триптиказо-соевый бульон с новобиоцином Среда Макконки CAYE broth + Carbadox
Singlepath® <i>Campylobacter</i> Duopath® – <i>Cereus</i> Enterotoxins Singlepath® <i>Legionella</i>	Кампилобактеры Энтеротоксины <i>B. cereus</i> Легионеллы	Обогащительный бульон Болтона M.Y.P. agar CGY бульон CYE agar base BCYE supplement GVPC supplement

лунка) полоска пропитана мечеными антителами к искомому антигену. Кроме того, в определенных местах (Т и С) нанесены еще две полосы немеченых иммобилизованных антител. Полоса Т соответствует тестовой зоне и содержит антитела к искомому антигену, а полоса С – контрольной зоне и содержит антитела, способные связывать меченые антитела из зоны нанесения материала.

Жидкий исследуемый материал вносится в специальную лунку, растворяет меченые антитела, которые вместе с током жидкости движутся к противоположному концу тест-системы. При наличии в материале искомого антигена они связываются с ним и дальше движутся уже в составе комплекса антиген–антитело. При прохождении тестовой зоны иммобилизованные антитела связываются с комплексом антиген–антитело, образуя так называемый «сэндвич». Благодаря его формированию меченые антитела задерживаются в тестовой зоне, и образуется окрашенная полоска. Не связавшийся избыток меченых антител при прохождении контрольной зоны (С) связывается с иммобилизованными антителами контрольной зоны, образуя комплекс.

Благодаря фиксации меченых антител в контрольной зоне также образуется окрашенная полоска, подтверждающая работоспособность тест-системы. Таким образом, в случае положительного результата образуются две полосы: в тестовой и контрольной зоне. При отрицательном результате (отсутствие искомого антигена) меченые антитела, не задерживаясь в тестовой зоне, сразу мигрируют в контрольную зону, где связываются с иммобилизованными антителами, образуя только одну полосу в зоне С.

В системах Duopath®, которые предназначены для идентификации сразу двух антигенов, в зоне нанесения исследуемого материала находится смесь двух антител и соответственно имеются две тестовые зоны для каждого антигена. Во всем остальном системы идентичны.

Таким образом, благодаря применению в системах Singlepath® и Duopath® иммунохроматографического метода выполнение анализа и учет результатов крайне упрощаются и не требуют ни высокотехнологичного оборудования, ни высококвалифицированного персонала. При этом относительно низкая чувствительность ИХА компенсируется этапом обогащения, который позволяет

исследовать образцы с низкими уровнями контаминации и подтверждает жизнеспособность исследуемых объектов.

ВАРИАНТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИХА-ТЕСТОВ

Тест-системы Singlepath® и Duopath® можно использовать как самостоятельные и как элемент классического бактериологического метода. В последнем случае ИХА тесты используются для оценки наличия целевых микроорга-

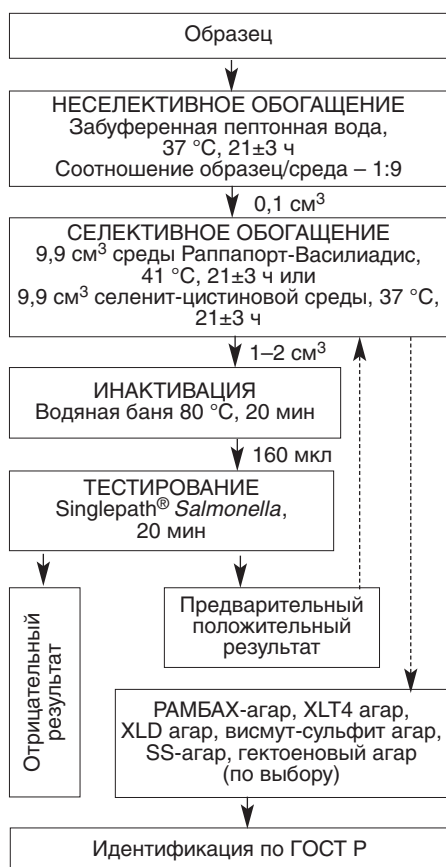


Рис. 2. Выявление бактерий рода *Salmonella* с использованием экспресс-теста Singlepath® *Salmonella*

низмов в обогащенном материале, что позволяет ускорить выдачу отрицательного результата или дать предварительный положительный ответ (рис. 2).

ИХА-тесты можно также использовать для ускоренной идентификации

колоний, выделенных при высеве обогащенной смеси на плотные селективные среды [2].

ВАЛИДАЦИЯ И СЕРТИФИКАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМ SINGLEPATH® И DUOPATH®

Эффективность тест-систем Singlepath® и Duopath® многократно подтверждена сравнительными испытаниями с классическими методами исследования [6–8]. После проведения независимых испытаний [5] авторитетная международная организация AOAC Research Institute сертифицировала тест-системы Singlepath® и Duopath®:

- Singlepath® *Salmonella* (сертификат № 060401);
- Singlepath® *E. coli* O157 (сертификат № 010407);
- Singlepath® *Campylobacter* (сертификат № 120401);
- Duopath® *Verotoxin* (сертификат № 020402).

Тест-системы Singlepath® и Duopath® получили признание в Российской Федерации, их применение регламентировано рядом документов. Использование ИХА-тестов Singlepath® и Duopath® как этапа, ускоряющего классический бактериологический метод определения сальмонелл, *Listeria monocytogenes*, энтерогемморрагической *E. coli* O157 и кампилобактера, нашло отражение в Методических рекомендациях Федерального центра Госсанэпиднадзора РФ № 24ФЦ/976 [2]. Кроме того, использование тест-систем Singlepath® *E. coli* O157 и Duopath® *Verotoxins* регламентировано в МУК 4.2.2963-11 [3], а Singlepath® *Listeria mono* – в ГОСТ 32031–2012 [1].

Выводы. Тест-системы Singlepath® и Duopath® производства Merck KGaA – это разрешенный к применению в РФ, экономичный, высокоспецифичный и достаточно чувствительный (в сочетании с обогащением) метод выявления патогенных микроорганизмов. Метод не требует сложного оборудования, высококвалифицированного персонала, является быстрым, надежным и удобным, благодаря чему может использоваться самостоятельно или как составная часть бактериологического метода. Тест-системы Singlepath® и Duopath® обеспечивают ускоренное получение отрицательного ответа и сокращают время идентификации патогенных микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 32031–2012 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*».
2. Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства Merck (Германия): методические рекомендации № 24ФЦ/976. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 23 с.
3. МУК 4.2.2963-11 «Методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых *Escherichia coli*, продуцирующих шига-токсины (STEC-культуры), и обнаружению возбудителей STEC-инфекций в пищевых продуктах».
4. Определение бактерий рода *Salmonella* методом твердофазного иммуноферментного анализа: методические рекомендации № 02.013-06. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2006.
5. Thompson L., Lindhardt Ch. Singlepath® *Salmonella* // Journal of AOAC International. 2006. V. 89. No 2. P. 417–432.
6. www.merckmillipore.com. «Singlepath® *E. coli* O157: Detection of *E. coli* O157 in 375g samples of ground beef and beef trim using Rapidcult *E. coli*».
7. www.merckmillipore.com. «Singlepath® *L'mono* and Singlepath® *Listeria*: Confirmation assay».
8. www.merckmillipore.com. «Singlepath® Emetic Tox Mrk for the qualitative detection of *Bacillus cereus* Emetic Toxin Marker».