



На правах рукописи

Рис

Маркунина Юлия Викторовна

**ВЕТЕРИНАРНО - САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА
ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОВОДСТВА ПРИ БОТУЛИЗМЕ
МЕТОДАМИ ЭКСПРЕСС - АНАЛИЗА**

16.00.06 - ветеринарная санитария, экология, зоогигиена и
ветеринарно - санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

05 ДЕК 2008

Чебоксары - 2008

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и в Федеральном государственном учреждении «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных - ВНИВИ» г. Казань

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
профессор
Волков Али Харисович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук,
профессор
Алексеев Геннадий Александрович

доктор биологических наук
Коксин Владимир Петрович

Ведущая организация: ФГОУ ВПО
«Башкирский государственный
аграрный университет»

Защита состоится 19 декабря 2008 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.070.02 при ФГОУ ВПО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия» (428003, г. Чебоксары, ул. К. Маркса, д. 29)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия»

Автореферат разослан «18» ноября 2008г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
профессор



Семенов В.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из главных задач ветеринарно - санитарной экспертизы является контроль качества пищевых продуктов и выявление возбудителей болезней и их токсинов, которые могут быть источником заболевания и отравления людей. Среди инфекционных болезней, которые могут быть причиной отравления людей и животных, особое место занимает ботулинический токсин.

Ботулизм не относится к часто встречающимся заболеваниям животных и среди инфекционных болезней не превышает сотой доли процента. Однако тяжелое течение болезни у людей с высокой летальностью не позволяет относить проблему ботулизма к второстепенным заболеваниям. Поэтому для своевременного принятия лечебно - профилактических мероприятий в таких случаях необходимо иметь набор диагностикумов для экспресс - индикации возбудителя болезни.

В последние годы в лабораторную практику для диагностики инфекционных болезней животных и людей внедряются новые тест - системы такие, как иммуноферментный анализ (ИФА), метод флюоресцирующих антител (МФА), радиоиммунный анализ (РИА), полимеразная цепная реакция (ПЦР) и т.д. Основным достоинством данных методов является их высокая чувствительность, экспрессность и возможность полной автоматизации постановки и учета.

Все вышеизложенное и обуславливает актуальность настоящей работы.

Цель и задачи исследований. Целью исследований является разработка современных высокочувствительных тест - систем для ветеринарно - санитарной оценки продуктов животноводства и экспресс - индикации возбудителя ботулизма и его токсина в них.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить культурально - морфологические, биохимические и антигенные свойства штаммов возбудителя ботулизма, хранящихся в музее штаммов ФГУ «ФЦТРБ - ВНИВИ» (г. Казань);
- разработать тест - систему МФА и ИФА для индикации возбудителя ботулизма и его токсина в продуктах животноводства и рыбководства;
- разработать метод отбора и подготовки проб для ветеринарно-санитарной оценки продуктов животноводства и индикации в них возбудителя ботулизма и его токсина.

Научная новизна. Изучены морфологические, тинкториальные, культурально - биохимические и антигенные свойства возбудителя ботулизма, хранящегося в музее штаммов ФГУ «ФЦТРБ - ВНИВИ» (г. Казань) в течение 20 и более лет. По результатам этих исследований разработаны методы получения антигенов и антител и на их основе тест - системы для ИФА и МФА.

Разработаны способы подготовки проб для ветеринарно - санитарной оценки продуктов животноводства и рыбководства и индикации в них возбудителя ботулизма и его токсина методами МФА и ИФА.

Научно - практическая ценность работы. Применение тест - систем МФА и ИФА позволит быстро и достоверно определять наличие возбудителя ботулизма и его токсина в исследуемом материале, способствуя предотвращению распространения и быстрой ликвидации его в случае появления.

Апробация работы. Результаты выполненных исследований доложены и обсуждены на ежегодных отчетных сессиях ФГУ «Федерального центра токсикологической и радиационной безопасности животных - ВНИВИ» (г. Казань). Основные положения диссертации доложены на Всероссийской научно - практической конференции «Проблемы экотоксикологического, радиационного и эпизоотологического мониторинга», посвященной 45 - летию ФГНУ ВНИВИ (Казань, 2005 г.); а также на международном симпозиуме «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радио-

нуклеидов и возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний», посвященном 45 - летию образования института (Казань, 2005 г.).

Публикация. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

На защиту выносятся следующие положения:

- изучение антигенных свойств возбудителя ботулизма и его токсина;
- методы разработки тест - систем для постановки иммунохимических реакций (ИФА, МФА);
- способы подготовки проб продуктов животноводства и рыбоводства для ветеринарно - санитарной экспертизы при ботулизме;
- ветеринарно - санитарная экспертиза продуктов животноводства и рыбоводства при ботулизме методами экспресс - анализа (ИФА и МФА).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 87 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 6 рисунками. Список используемой литературы включает 163 наименования, из них 114 источников отечественных авторов, 49 зарубежных.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в 2003 - 2006 г.г. на кафедре ветеринарно - санитарной экспертизы ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и в лаборатории по хранению и изучению штаммов возбудителей особо опасных болезней животных ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных - ВНИВИ» (г. Казань).

Работа проводилась в соответствии с планами НИР ВНИВИ по заданию Департамента ветеринарии МСХ РФ (№ гос. регистрации 01200202602).

В ходе работы были использованы следующие материалы:

1. Штаммы возбудителя ботулизма, хранившиеся в лаборатории по изучению штаммов особо опасных болезней:

штамм №35 тип А «Пухно» выделен из трупa человека; штамм 16 - Я тип В выделен из фуражного ячменя; штамм 255 тип В; штамм 231 тип С; штамм 165 тип Д; штамм 1352 тип G выделен из почвы; штамм 5964 тип F выделен из почвы; штамм 153 тип E выделен из рыбы.

2. Питательные среды: мясопептонный агар (МПА); мясопептонный агар с добавлением 1% глюкозы; глюкозо - кровяной агар Цейслера; среда Китта - Тароцци; среда Китта - Тароцци с добавлением 1% глюкозы; бульон Хоттингера под вазелиновым маслом; среды Гисса; обезжиренное молоко.

3. Оборудование: термостат; анаэростат; центрифуги; холодильные установки; люминесцирующий микроскоп МЛ - 3; весы аналитические с разновесами типа АДС - 200; спектрофотометр СФ - 46; магнитная мешалка; водяная баня.

4. Реактивы: в различных микробиологических и иммунологических исследованиях применялись стандартные растворы, необходимые химические реактивы, сыворотки, метаболиты и коммерческие анатоксические противоботулинические поливалентные и моновалентные сыворотки (А, В, С, Д, Е).

5. Подопытные животные: кролики породы «Шиншилла», «Серый великан» 12 - 18 месячного возраста, живой массой 2,5 - 3,5 кг - 50 гол.; морские свинки живой массой 200 - 400 г - 100 гол.; белые мыши живой массой 14 - 20 г - 150 гол.

Для поддержания и расщепки референтных штаммов возбудителя ботулизма использовали среду Китта - Тароцци. Для получения матровой расщепки, при изготовлении ботулинического токсина, применяли среду, состоящую из ферментативного перевара мяса (среда Хоттингера), печеночного экстракта и жидкого пептона Мартена. Посевной материал вносили в количестве 2 - 3% к объему питательной среды, перед посевом добавляли 0,5% глюкозы. Оптимальная температура для роста и токсинообразования типов возбудителя А, В, С 30 - 35⁰С, а для остальных - 26 - 28⁰С. Время для токсинообразования от 5 до 12 суток. Определение титра токсичности культу-

рального фильтрата проводили подкожным заражением белых мышей. Полученный ботулинический токсин переводили в анатоксин внесением 0,55% формалина. Формалин вносили дробно: 0,4% вносили сразу после окончания культивирования и 0,15% - через 6 суток. Инактивацию ботулинической культуры проводили при температуре 37⁰С в течение 30 - 35 суток. Токсин от вегетативных клеток *Cl. botulinum* отделяли путем охлаждения в холодильнике (4±2)⁰С в течение 18 - 20 часов и фильтровали с помощью мембранных фильтров «Владипор» № 4 и 6.

Заражение животных возбудителем ботулизма и его токсином, а также исследование зараженного материала проводили согласно санитарным правилам СП 1.3.1285 - 03 по работе с возбудителями особо опасных болезней I и II групп патогенности.

Для индикации возбудителя и его токсина использовали экстракт из проб консервированного мяса и рыбы, а также антигены из вегетативных клеток, полученные путем химического и термического экстрагирования.

В полученных антигенах и анатоксине определяли содержание белка спектрофотометрическим методом. Специфическую активность антигенов определяли в РНГА, ИФА, МФА. Чистоту, стерильность и безвредность, полученных антигенов и анатоксина проверяли в соответствии с общепринятыми в бактериологии методами. Оценку влияния антигена и анатоксина на организм животных осуществляли в экспериментах на лабораторных животных по состоянию клинического и иммунологического статуса (РНГА, ИФА, РИ).

Для изучения антигенных свойств возбудителя ботулизма готовили микробную массу. Исследуемый штамм возбудителя ботулизма заседали на среду Китта - Тароцци с добавлением 1% глюкозы с последующей инкубацией при температуре (35±2⁰С). Через три - пять суток выросшие культуры контролировали на чистоту роста и изучали морфологию путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму.

Культуральные свойства штаммов изучали путем посева на среду Китта - Тароцци, а характер глубинных колоний - на сахарном агаре; подвижность - ме-

тодом висячей капли; ферментативные свойства - посевом на среды Гисса, на обезжиренное молоко, а также по образованию сероводорода.

Вирулентность штаммов *Cl. botulinum* определяли заражением белых мышей и морских свинок с последующей оценкой характерных для возбудителя ботулизма клинических признаков.

Антигенные свойства культур штаммов *Cl. botulinum* изучали в ИФА с использованием антител против иммуноглобулинов кролика, меченных пероксидазой хрена, изготовленных НПО НИИ им. Н.Ф.Гамалея и в МФА с использованием люминесцирующих сывороток, изготовленных в ФГУ «ФЦТРБ - ВНИВИ» (г. Казань).

Стерильность полученных иммунопероксидазных конъюгатов проверяли посевом на сахарный МПА. Посевы со всеми средами выдерживали в анаэробных условиях при температуре $(35 \pm 2^\circ\text{C})$ в течение 15 суток. Питательные среды с посевами должны оставаться стерильными.

Активность иммунопероксидазных конъюгатов определяли в прямом варианте ИФА.

Ветеринарно - санитарная экспертиза продуктов животноводства для выявления ботулинического токсина

Одним из достоверных лабораторных подтверждений диагноза на ботулизм является обнаружение и идентификация токсина в реакции нейтрализации (РН) токсина на белых мышцах. Метод заключается в смешивании экстракта из подозреваемых пищевых продуктов с анатоксической противоботулинической поливалентной сывороткой (в течение 45 минут) с последующим введением полученной смеси белым мышам. При наличии в исследуемом субстрате ботулинического токсина в живых остаются белые мыши, получившие смесь, в которой произошла нейтрализация токсина анатоксической сывороткой. Все белые мыши, получившие один токсин должны погибнуть.

В тоже время при всех своих положительных качествах реакция нейтрализации на мышах имеет ряд недостатков, которые снижают ее диагностическую ценность. Для постановки РН требуются абсолютно здоровые линейные мыши и к тому же результаты реакции (РН) продолжительны от 27 до 72 часов. Метод дает качественное, а не количественное определение токсина в исследуемом материале. При этом реакция малочувствительна и позволяет идентифицировать токсин только в продуктах питания, но не в патматериале. Гибель мышей в ходе эксперимента не исключает и не подтверждает диагноз на ботулизм, т.к. существует реальная возможность присутствия в исследуемом материале другого вида яда. И в этом случае для постановки достоверного диагноза необходимо выделение самих вегетативных форм возбудителя ботулизма из продуктов питания и патматериалов (сыворотка крови, кал и т.д.).

Для подтверждения вышеизложенного нами проведены эксперименты по индикации возбудителя ботулинического токсина в продуктах питания (консервы).

Имитацию зараженного продукта питания ботулиническим токсином провели на мясных консервах. Для этого банки с мясными консервами вскрывали, содержимое перемешивали, перекладывали в другие стерильные стеклянные банки и контаминировали спорами возбудителя ботулизма и ботулиническим токсином типов А и В. Контаминацию мясных консервов проводили следующими концентрациями анатоксина (по белку мг/мл): первая проба - 0,0001 мг; вторая проба - 0,001 мг; третья проба - 0,01 мг и концентрациями спор: четвертая проба - 100 м.к.; пятая проба - 1000 м.к.; шестая проба - 1000000 м.к. на 1 г исследуемого объекта.

Отбор проб проводили по 10 г с каждой пробы, которые смешивали 1:5 с 0,85% раствором хлористого натрия. Первую, вторую, третью пробы шуттелировали на магнитной мешалке и фильтровали через бумажные фильтры. Подготовленные таким образом три пробы смешивали 1:1 с противоботулинической сывороткой каждую и вводили белым мышам. Эти же пробы также

были испытаны в РП и РНГА. Пробы 4, 5, 6 суспензировали 1:5 в физиологическом растворе, шугтелировали и центрифугировали при 7 - 10 тыс. об/мин. Полученный осадок по 0,2 мл заседали на среды Китта - Тароци и Цейслера.

Результаты индикации возбудителя ботулизма и его токсина в продуктах питания представлены в таблице 1.

Таблица 1. Индикация возбудителя ботулизма и его токсина в мясных консервах

Методы исследований	Токсин, концентрация на мг/мл			Возбудитель, м.к. на мл		
	0,0001	0,001	0,01	100	1000	1000000
РН на белых мышах	+	+	+	Н.и.	Н.и.	Н.и.
РП	-	-	-	Н.и.	Н.и.	Н.и.
РНГА	-	-	-	-	-	+
Бактериологический	-	-	-	+	+	+

Примечание: «+» - положительная проба
«-» - отрицательная проба
«Н.и.» - не исследовали

Из таблицы видно, что выявить ботулинический токсин в мясных консервах удалось только в РН токсина на белых мышах. РП и РНГА не выявили наличие токсина в испытанных концентрациях.

Возбудитель ботулизма в серологических реакциях не обнаруживался в испытанных концентрациях, а выявлялся только в посевах на питательных средах и микроскопическим методом, при окраске препаратов из исследуемого материала.

Все описанное выше дает основание вести поиск новых средств и методов экспресс - индикации возбудителя ботулизма и его токсина в продуктах питания. Внедрение высокочувствительных тестов в лабораторную практику не только облегчило бы и ускорило выявления возбудителя и его токсина, но и повысило бы эффективность индикации.

В предлагаемой работе разрабатывается решение проблемы путем соз-

дания тест - систем для индикации возбудителя ботулизма и его токсина в пищевых продуктах на основе МФА и ИФА.

Изучение фенотипических свойств, различных штаммов *Cl. botulinum*

Для решения поставленных задач, на первом этапе были изучены биохимические свойства различных штаммов возбудителя ботулизма. В результате проведенных исследований установлено, что при посеве отдельных штаммов возбудителя ботулизма на среды с сахарами, они ферментируют с образованием газа и кислоты глюкозу, мальтозу. Однако этими свойствами обладают не все испытанные штаммы (165, 1352), что может осложнить идентификацию микроба и дифференциацию его токсина. Штамм серовара В обладает высокой протеолитической активностью: он свертывает обезжиренное молоко, разжижает МПДЖ, а у сероваров С, D, F эти свойства были выражены слабо.

Токсинообразующие свойства у изученных штаммов сохранились не одинаково. Наиболее активным был токсин, полученный из серовара В. Однако исследования показали, что из семи изученных сероваров *Cl. botulinum*, каждый дает специфическую реакцию с гомологичной сывороткой и только серовар А (штамм 35 «Пухно») был наименее активен.

В антигенном отношении все изученные штаммы обладали иммуногенной специфичностью в РН на белых мышах и опять же серовар А в антигенном отношении был слабее, чем остальные типы. Причиной тому может быть длительное хранение на искусственных питательных средах, что привело к утрате основных свойств изученных культур *Cl. botulinum*. Как известно из литературных источников серовар А в антигенном отношении должен быть более активным, чем другие штаммы. Ботулинический токсин типа А чаще является одной из причин отравления людей продуктами питания. Поэтому нами для работы был выбран штамм 35 (А) для производства высокоактивных диагностических препаратов; а для производства высокоактивных диаг-

ностических препаратов необходимы штаммы, обладающие стабильными свойствами, которые бы в процессе хранения и пересевов на питательные среды, оставались неизменными.

Для того чтобы штаммы сохранили свои изначальные свойства, необходим периодический пассаж на восприимчивых лабораторных животных. В нашем случае для пассажа, с целью восстановления фенотипических свойств, мы применили чувствительных к возбудителю ботулизма морских свинок. В результате многократных пассажей *Cl. botulinum* на морских свинках нам удалось восстановить вирулентные свойства штамма 35 - А «Пухно».

О возможности утраты биохимических свойств возбудителя ботулизма высказывают также В.Н. Никифоров и др. (1985). В то же время авторы считают, что культуры клостридий способны, в свою очередь, восстановить первоначальные свойства.

Изучение антигенных свойств возбудителя ботулизма и его токсина

Продолжая исследования по изучению антигенных свойств у штаммов, утративших вирулентность, необходимо было установить эти отличия в иммунохимических реакциях (ИФА). ИФА ставили общепринятым методом с использованием диагностической ботулинической сыворотки, меченой пероксидазой. Иммунопероксидазные конъюгаты были получены нами в лаборатории по хранению и изучению штаммов возбудителей особо опасных болезней животных ФГУ «ФЦТРБ - ВНИВИ» (г. Казань).

Изучаемые ботулинические токсины, полученные из различных штаммов *Cl. botulinum* всегда специфично вступали в реакцию ИФА. Однако штаммы, утратившие вирулентность, не реагировали с иммуноферментным конъюгатом.

Таким образом, в результате изучения морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических и антигенных свойств культур возбудителя ботулизма была выявлена неоднородность их по основным свойствам.

Культуры отличались между собой в основном по биохимическим свойствам. При посеве на обезжиренное молоко авирулентные штаммы не свертывали его, а при изучении сахаролитических свойств образование кислоты и газа не наблюдалось. Антиботулинические сыворотки, меченные пероксидазой, реагировали только с вирулентными штаммами.

Учитывая все вышеизложенное, мы продолжили поиск изыскания эффективного антигена для гипериммунизации кроликов, который позволил бы получить высокоактивные сыворотки к ботулиническому токсину.

По результатам экспериментов, проведенных на первом этапе, был отобран штамм 35 - А «Пужно» возбудителя ботулизма. Из отобранной культуры выделили три вида антигена: жгутиковый, белковый и анатоксин. Жгутиковый антиген получали путем вегетации спор возбудителя ботулизма на глюкозо - кровяном агаре Цейсслера. Белковый антиген выделяли воздействием на вегетативные клетки поочередно аминокaproновой кислоты и 3% раствора додецилсульфата натрия. Токсин получали культивированием возбудителя на среде, состоящей из ферментативного перевара мяса (среда Хоттингера), печеночного экстракта и жидкого пептона Мартена в течение 7 - 8 дней, с последующим переводом его в анатоксин добавлением 0,55% нейтрального формалина в течение 30 - 35 суток.

Активность полученных антигенов изучали в ИФА, а иммуногенные свойства - в сыворотке крови иммунизированных кроликов. Для этого лабораторных животных гипериммунизировали в отдельности белковым антигеном и анатоксином. Активность сывороток, полученных на антигены, изучали с гомологичными антигенами в ИФА. Результаты исследований показали, что наиболее активными оказались антисыворотки крови кроликов к белковому антигену и анатоксину. Высокая иммуногенная активность белковых антигенов и анатоксина возбудителя ботулизма подтверждается данными В.Н. Никифорова и др. (1985).

Белковый антиген и анатоксин в дальнейшем использовали как материал для получения диагностических сывороток при разработке тест - систем МФА и ИФА соответственно.

Разработка способа получения ботулинической сыворотки

Для получения гипериммунных сывороток на кроликах провели испытание трех схем введения антигена.

По первой схеме иммунизацию кроликов проводили пятикратным введением антигена в сочетании полным и неполным адьювантом Фрейнда внутрикожно вдоль позвоночного столба в пять точек с каждой стороны. Вторая схема иммунизации заключалась в трехкратном внутривенном введении антигена с интервалом 6 - 7 дней. По третьей схеме иммунизацию осуществляли однократным внутривенным и внутримышечным введением антигена.

Активность полученных сывороток определяли в ИФА. Исследованиями установлено, что высокие титры антител были выявлены при первой схеме иммунизации на анатоксин и белковый антиген. Титр антител составил 1:4096 и 1:8192 соответственно.

Об эффективности многократного введения антигена в целях получения диагностических сывороток говорили многие исследователи (Е.А. Волков и др., 1980; Г.В. Булаев и др., 1985). При таком способе введения антигена повышается авидность антител сыворотки крови, что важно при получении диагностических препаратов.

Очистку глобулиновых фракций из сыворотки крови получали путем высаливания сернокислым аммонием и разделения белков глобулиновой фракции на хроматографической колонке с ДЭАЭ - целлюлозой. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, по формуле: разведение $\times 280/1,35$. Результаты исследования показали, что белок в глобулине сыворотке составил 20 - 30 мг/мл. Активность иммуногло-

булинов, выделенных из сывороток крови кроликов, проверяли в ИФА. Титр антител был в пределах 1:8192 - 1:16384.

Из полученных результатов можно заключить, что выбранный нами метод выделения и очистки иммуноглобулинов в иммунообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ - целлюлозой, не изменяет активность и специфичность антител сывороток крови.

Ионообменная хроматография в течение последующих лет принята на вооружение во многих лабораториях. Исследователи в области белковой химии считают, что белки сыворотки крови, подвергнутые хроматографии, теряют активность (Г. Детерман, 1970). В дальнейшем, благодаря появлению улучшенных материалов, используемых для хроматографии, таких как ДЭАЭ - целлюлоза, сефадекс и т.д., положение в области очистки белков сыворотки изменилось. В настоящее время успешно можно очистить до иммуноглобулинов любого класса и выделить $F(ab)_2$ - фрагменты иммуноглобулинов сыворотки крови (С.С. Маренникова и др., 1982; С.В. Буерова и др., 2001).

Изготовление тест - систем для постановки ИФА и МФА

Иммунохимические тест - системы для постановки ИФА И МФА стали доступными для лабораторий любого уровня. Предпочтительность использования того или иного теста зависит от конкретных условий. Например, для ветеринарно - санитарной экспертизы продуктов животноводства желательно применять сочетание нескольких методов исследования, которые взаимно контролировали бы результаты, тем самым, повышая их достоверность. Наиболее перспективным в этом плане является сочетание двух реакций МФА и ИФА. В подтверждении этому имеются обширные научные материалы и статьи, где проанализированы основные принципы ИФА и МФА (А.Т. Яковлев и др., 1990; А.Н. Егоров и др., 1991).

Придерживаясь мнения вышеупомянутых авторов, мы разработали прямой вариант ИФА на основе метки иммунных сывороток к ботулиническому токсину ферментом пероксидаза из хрена и МФА на основе метки иммунных сывороток к антигену возбудителя ботулизма флуоресцирующим изотиоцианатом натрия (ФИТЦ).

По результатам исследования были разработаны тест - системы МФА и ИФА для выявления возбудителя ботулизма и его токсина в продуктах животноводства и рыбоводства соответственно.

На втором этапе наших исследований провели испытания полученных тест - систем на вышеуказанных объектах.

Ветеринарно-санитарная экспертиза продуктов животноводства и рыбоводства

Отбор и подготовка проб к исследованию

Для исследования использовали пробы мясных и рыбных консервов. Для имитации заражения ботулиническим токсином, контаминировали спорами возбудителя ботулизма и его токсинами мясные и рыбные консервы.

В первом случае мясные консервы (500 г) вскрывали, прогревали в кипящей бане при температуре $(100\pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 1 - 2 часов, расфасовывали по 100 г в стеклянные банки с учетом высокого залива и вносили споры возбудителя ботулизма из расчета 1000 - 100000 м.к. на 1 г. Банку герметично закатывали крышкой и оставляли при комнатной температуре $(20\pm 2)^\circ\text{C}$ на 5 - 30 дней.

Во втором случае к мясным и рыбным консервам, прогретым до $(100\pm 5)^\circ\text{C}$, вносили коммерческий ботулинический токсин типов А, В, С, Е, каждый токсин в отдельности, с последующей экспозицией в течение 3 - 4 часов. Схема контаминации мясных и рыбных консервов приведена в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Схема контаминации мясных и рыбных консервов спорами возбудителя ботулизма

Объект исследования	Навеска продукта (г)	Объем взвеси спор (мл)	Количество спор в мл взвеси	Количество спор в 1г продукта
контаминированная спорами	100	10	10^4	10^2
	100	10	10^5	10^3
	100	10	10^6	10^4
	100	10	10^7	10^5
Неконтаминированный продукт	100	0	0	0

Таблица 3. Схема контаминации мясных и рыбных консервов ботулиническим токсином

Пробы контаминированные токсинами, каждый в отдельности.	Навеска продукта (г)	Объем взвеси токсина (мл)	Количество токсина (мг) в мл	Количество токсина мг/г продукта
А, В, С, Е	100	10	0,1	0,001
	100	10	0,01	0,0001
	100	10	0,001	0,00001
	100	10	0,0001	0,000001
Неконтаминированная проба	100	0	0	0

Примечание: контаминацию проб мясных и рыбных консервов осуществляли ботулиническим токсином каждого типа в отдельности.

Из таблицы 2 следует, что контаминацию проб проводили спорами *Cl. botulinum* в объеме 10 мл с концентрацией микробной взвеси 10^4 - 1 проба; 10^5 - 2 проба; 10^6 - 3 проба; 10^7 - 4 проба на 100 г пищевого продукта.

В таблице 3 контаминацию проб ботулиническим токсином каждого типа (А, В, С, Е) в объеме 10 мл с содержанием белка в токсине 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,000001 мг на 100 г пищевого продукта.

Подготовленные таким образом продукты питания переносили в боксовые помещения и вскрывали с соблюдением санитарных правил СП 1.2.011.03.

Отбор проб проводили из каждой банки по всей глубине мясных консервов стерильным шпателем в количестве 10±5 г в стерильные колбы. Пробы суспензировали в физиологическом растворе в соотношении 1:10, отстаивали и фильтровали через мембранные фильтры «Владипор» №4. Далее полученный фильтрат использовали для проведения исследования в ИФА и для постановки РН токсина на белых мышах, а фильтр помещали в ступки с битым стеклом, наливали 10 мл физраствора, растирали и делили на две части. Одну часть из них использовали для МФА, вторую вводили подкожно морским свинкам и далее исследовали общепринятыми бактериологическими методами.

Индикация ботулинического токсина в мясных и рыбных консервах в ИФА

Эксперименты по выявлению возбудителя ботулизма и его токсина в продуктах животноводства и рыбоводства проводили в условиях лаборатории. Для этого были контаминированы в отдельности мясные и рыбные консервы возбудителем ботулизма и его токсином. Отбор проб проводили с разных мест по всей глубине мясных консервов.

Исследованиями установлено, что ботулинический токсин типа А выявляется во всех пробах иммунопероксидазным конъюгатом в ИФА. Чувствительность метода зависит от концентрации токсина в продуктах. Минимальная концентрация токсина, улавливаемая в ИФА, составила 0,000001 мг/мл. Достоверность ИФА коррелировала результатами в реакции нейтрализации токсина на белых мышах. Однако РН позволяла оценить качество токсина,

количественная оценка была не возможна. Результаты наших исследований согласуются с данными К.С. Азаренок (1970). Автор для выявления ботулинического токсина испытал ряд серологических реакций (РП, РСК, РНГА) и пришел к выводу, что испытанные реакции мало чувствительны и дают перекрестные реакции между типами ботулинического токсина. Учитывая то, что существуют перекрестные реакции между токсинами, мы приступили к изучению специфичности ИФА с разработанными диагностикумами.

Индикацию ботулинического токсина типов В, С и Е проводили в ИФА с иммунопероксидазным конъюгатом к токсину типа А. При этом установлено, что к иммунопероксидазному конъюгату типа А выявляется тип токсина В ($K_{cp} = 2,7 \pm 0,2$), концентрация токсина при этом составила 0,001 мг/мл. Низкие концентрации (0,0001 – 0,000001 мг/мл) токсина типа В в продуктах питания не обнаруживались. Токсин типов Е и С с испытанным конъюгатом в ИФА в перекрестную реакцию не вступал. Из этого можно предположить, что разработанный конъюгат к типу А специфично вступает в реакцию ИФА с гомологичным токсином. И только в больших концентрациях (0,01 мг/мл) перекрестно реагирует с токсином типа В. Испытанные токсины типов С и Е перекрестно не реагировали. Результаты РН на белых мышах коррелировали с результатами ИФА.

О высокой чувствительности ИФА и количественного определения токсина в продуктах питания пишет В.Н. Никифоров и др., 1980.

Одним из достоверных методов лабораторной диагностики ботулизма является обнаружение и идентификация токсина *Cl. botulinum* в продуктах питания. В то же время выявление только ботулинического токсина без вегетативных форм ботулизма в продуктах питания не означает, что диагноз достоверный (Faston E., Meyer K., 1974; Dowell V et al., 1977). Поэтому индикация ботулинического токсина в продуктах питания должна сопровождаться обнаружением выделения самого возбудителя и его токсина.

Исходя из вышеизложенного наряду с выявлением ботулинического токсина в продуктах животноводства методом ИФА была поставлена задача по разработке метода иммунофлуоресценции (МФА).

Индикация спор возбудителя ботулизма в мясных и рыбных консервах в МФА

Эксперименты по индикации спор возбудителя ботулизма методом МФА проводили в мясных консервах, контаминированных возбудителем ботулизма штамма 35 (А) в концентрациях от 10 до 10^5 спор в 1 г. В этих опытах было установлено, что вегетативные формы возбудителя выявляются в испытанных пробах в течение 2 - 5 суток. Последующие сутки возбудитель выявляется в меньших количествах по причине лизиса вегетативных клеток ботулизма в мясных консервах.

Иммунофлюоресцирующие глобулины в МФА перекрестно реагировали со штаммом 16 - Я (В) и не реагировали со штаммами 231 (С) и 153 (Е). В то же время посевы на питательные среды и микроскопия мазков выявляли возбудителя ботулизма в контаминированных пробах. Чувствительность МФА составила 1000 спор на грамм продукта при положительной корреляции с бактериологическими методами.

Индикация ботулинического токсина в вяленой рыбе

Одной из часто встречающихся причин отравления людей ботулиническим токсином является вяленая рыба. Опыты по имитации зараженной рыбы возбудителем ботулизма проводили с соблюдением санитарных правил СП 011.094.03.

Заражение свежей рыбы, спорами возбудителя ботулизма, проводили штаммом 153 (тип Е) в брюшную полость с последующим вялением при комнатной температуре в течение 10 - 30 дней.

Отбор и подготовка проб к исследованию. Подготовленную выше описанным методом рыбу измельчали ножницами, добавляли дистиллированную

воду в соотношении 1:10, выливали в стакан гомогенизатора и гомогенизировали. После отстаивания надосадок фильтровали через мембранные фильтры «Владипор» №4. Затем фильтрат исследовали на ботулинический токсин методом ИФА, а из фильтра делали мазки и исследовали в МФА.

Исследованиями установлено, что ботулинический токсин обнаруживается в ИФА, а его возбудитель в МФА. ИФА специфично выявляет токсин типа Е в концентрации 0,00001 мг/мл, и в больших концентрациях - 0,01 мг/мл токсин типа А. МФА специфично выявляет только споры возбудителя ботулизма типа Е. Достоверность исследований подтверждается бактериологическими методами.

Таким образом, исследованиями установлено, что испытанные тест - системы для индикации возбудителя ботулизма и его токсина в продуктах животноводства и рыбоводства, показали высокую специфическую активность. Результаты ИФА и МФА коррелировали в 100% случаев с бактериологическими методами. По мнению В.И. Покровского, Ф.Б. Семина (1982) внедрение в лабораторную практику иммунохимических тест - систем с автоматической установкой снижает стоимость анализа вдвое и повышает достоверность результатов. Внедрение разработанных нами тест - систем иммуноферментной и флуоресцирующей в ветеринарно - санитарную экспертизу позволит более планомерно и масштабно проводить диагностические исследования и индикацию возбудителя ботулизма и его токсина в продуктах животноводства.

ВЫВОДЫ

1. Проведен морфологический, культуральный, биохимический и антигенный анализ различных штаммов возбудителя ботулизма. Установлено, что в процессе длительного хранения, в течение 20 и более лет, на искусственных питательных средах штаммы возбудителя ботулизма теряют биохимическую активность.

2. Пассажи штаммов возбудителя ботулизма на лабораторных животных ; обеспечивает восстановление сохранности их фенотипических свойств. Утрата биохимических свойств штаммов возбудителя ботулизма приводит к снижению их антигенной активности.
3. Белковый антиген возбудителя ботулизма, полученный путем экстракции додецилсульфатом натрия, обладает высокой иммуногенной и антигенной активностью. При введении в организм лабораторных животных он обеспечивает титр антител 1:8192. На основе полученных антигенов разработаны способы получения диагностических тест - систем для индикации возбудителя ботулизма и его токсина в продуктах животноводства и рыбоводства методами МФА и ИФА.
4. Разработан способ обнаружения возбудителя ботулизма и его токсина в продуктах животноводства, обеспечивающий ускоренную индикацию (в течение 2 - 3 часов) методами МФА и ИФА.
5. Подготовка проб с концентрированием возбудителя ботулизма на мембранных фильтрах позволит выявлять его наличие в продуктах животноводства и рыбоводства в концентрации 1000 - 100000 м.к./г в МФА и его токсина – 0,000001 мг/мл в ИФА.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Система поддержания производственных штаммов возбудителя ботулизма в лаборатории по хранению и изучению штаммов возбудителей особо опасных болезней ФГУ «ФЦТРБ - ВНИВИ» (г. Казань).
2. Применение тест - систем ИФА и МФА для ветеринарно - санитарной оценки мясных и рыбных консервов на наличие возбудителя ботулизма и его токсина регламентирует «Методические рекомендации по ветеринарно – санитарной экспертизе продуктов животноводства и рыбоводства при ботулизме методами экспресс - анализа (МФА, ИФА)», утвержденные ГУВ КМ РТ 24 ноября 2007 года.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Маркунина, Ю.В. Обнаружение возбудителя ботулизма у экспериментально зараженных животных / Ю.В. Маркунина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. Том 183. – Казань, 2006, с. 124 – 127.
2. Маркунина, Ю.В. Определение устойчивости ботулинического токсина / Ю.В. Маркунина, С.А. Климина // Материалы Всероссийской научно - практической конференции, посвященной 45-летию ФГНУ ВНИВИ (14 - 15 апреля 2005г.) «Проблемы экотоксикологического, радиационного и эпизоотологического мониторинга». - Казань, 2005. - Т.1. - С. 317 – 319.
3. Маркунина, Ю.В. Получение флюоресцирующей ботулинической сыворотки / Ю.В. Маркунина, А.Х. Волков, А.К. Галиуллин // Материалы Всероссийской научно - практической конференции, посвященной 45-летию ФГНУ ВНИВИ (28 - 30 ноября 2005г.) «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклеидов и возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний». - Казань, 2005. - Т.2. - С. 220 - 222.
4. Галиуллин, А.К. Индикация ботулинического токсина в продуктах животноводства / А.К. Галиуллин, Ю.В. Маркунина, А.Х. Волков, Э.Н. Мустафина// Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. Том 191. - Казань, 2008, с. 49.
5. Маркунина, Ю.В. Разработка способа получения диагностической ботулинической сыворотки / Ю.В. Маркунина, А.К. Галиуллин, А.И. Ибрагимова, В.А. Курамшина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. Том 192. - Казань, 2008, с. 49 - 53.

10

Подписано к печати *13. 11. 08.*
Заказ *302* Тираж *100* экз.
Бумага офсетная

Формат 60x84/16
Усл.-печ. л. *1.0*
Печать RISO

Центр информационных технологий КТГАВМ
420074, Казань, Сибирский тракт, 35.