

УДК 619:579

Т. О. ГАРКАВЕНКО, кандидат ветеринарних наук.

В. С. БАРАНОВ,

Н. Я. МЕХ, аспірант

І. В. СЕМЕНЧУКОВА, О. Л. КРАВЦОВА, Т. О. ДЯЧЕНКО

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ

АЛЬТЕРНАТИВНИЙ ЕКСПРЕС–МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ САЛЬМОНЕЛ «VIDAS SLM» ІЗ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА КОРМІВ З ВИКОРИСТАННЯМ АВТОМАТИЗОВАНОГО ІМУНОАНАЛІЗАТОРА «MINI VIDAS»

Проаналізовано виявлення мікроорганізмів роду із харчових продуктів та кормів еталонним аналітичним методом та альтернативним методом «VIDAS SLM». Обґрунтовано необхідність впровадження експрес-методу в лабораторну практику бактеріологічних відділів державних лабораторій ветеринарної медицини України.

Ключові слова: Salmonella, VIDAS, експрес-метод, виявлення

Сальмонельоз розглядається як одне з найбільш небезпечних захворювань у птахівництві всіх країн світу. Він викликає загибель птиці, бактеріоносійство і є причиною виникнення токсикоінфекцій у людей. Одним з основних джерел збудника є хвора птиця, яйця та інші продукти птахівництва [1]. За даними ВООЗ, захворюваність людей сальмонельозом за останнє десятиліття зросла шестикратно, а в країнах СНД - у сім разів [2].

Етіологічними агентами сальмонельозу є велика група мікроорганізмів, більш ніж 2500 серотипів роду *Salmonella*, родини *Enterobacteriaceae*, серед яких найбільше соціальне значення мають *S. Typhimurium*, *S. enteritidis* та *S. infantis*.

Виявлення сальмонельозів надзвичайно ускладнене тим, що клінічний їх прояв відрізняється надзвичайним поліморфізмом, від важких форм генералізованої інфекції або токсикоінфекції до безсимптомного бактеріоносійства внаслідок чого випадки захворювання залишаються поза увагою лікарів і, отже, не враховуються офіційною статистикою.

Присутність сальмонели в продуктах харчування не впливає на органолептичні показники їх якості [3].

Мікробіологія сьогодні характеризується розвитком нових ефективних діагностичних технологій, що засновані на глибоких фундаментальних знаннях біології мікроорганізмів і передових інженерно-технічних рішеннях задач автоматизації та підвищення ефективності аналізу. У зв'язку з цим виникає необхідність у вдосконаленні наявних імунобіологічних методів, створенні нових експрес-методів діагностики та індикації, спрямованих на скорочення часу проведення аналізу, його спрощення при одночасному

збільшенні надійності і легкості інтерпретації отриманих результатів при високій чутливості та специфічності [4].

Класичним методом виявлення сальмонельозної інфекції в харчових продуктах, продовольчій сировині та об'єктах зовнішнього середовища є бактеріологічний метод (посів досліджуваного матеріалу на відповідні поживні середовища, виділення чистої культури сальмонел і їх ідентифікація). Істотним недоліком класичного методу виявлення сальмонел є тривалість досліджень. Альтернативні методи дозволяють істотно скоротити час виявлення цих бактерій [5].

Мета роботи – провести порівняльні дослідження по виявленню *Salmonella adabraka* класичним методом (згідно ISO 6579, який на міжнародному рівні визнано еталонним аналітичним) та альтернативним методом «VIDAS SLM» із застосуванням імунофлуорисцентного аналізатора «mini VIDAS»; визначити перспективу використання експрес-методу у практичній діяльності бактеріологічних відділів державних лабораторій ветеринарної медицини.

Матеріали та методи: при проведенні дослідження нами використовувались наступне обладнання та матеріали – стерилізатор, автоклави, термостати, ламінарні шафи, аналітичні ваги, водяна баня, рН-метр, ГОСТовані піпетки, мультипараметричний автоматичний імуноаналізатор «Mini Vidas», лабораторні горілки, «Vortex», багміксер, пакети для гомогенізації, бактеріологічні петлі.

Методи виявлення *Salmonella adabraka* із харчових продуктів та кормів були еталонний класичний (ISO 6579) та альтернативний («VIDAS SLM»). Також використовувалась нормативно-технічна документація, власні дослідження та наукові публікації.

Для дослідження використовували п'ять різних матриць: риба свіжоморожена, м'ясо свіжоморожене, молочні продукти (сир твердий), яйця курячі, комбікорм.

Матриці досліджували у вихідному стані (з нульовим рівнем зараження), контаміновані *Enterobacter* (для визначення специфічності методу) та контаміновані *Salmonella adabrcka* в низькій (5×10^1 мікробних клітин/ на 25 г зразку) та високій (2×10^3 мікробних клітин/ на 25 г зразку) концентраціях (з метою визначення чутливості методу), повторюючи кожне дослідження п'ять разів. Дослідження еталонним та альтернативним методом проводили за схемою наведеною на рис. 1 та рис. 2 відповідно. Ідентифікацію проводили згідно схеми, наведеної на рис.3.

Результати власних досліджень.

Класичні мікробіологічні методи випробування, спрямовані на виявлення сальмонел, досить тривалі. За отримання негативного результату при дослідженні продуктів харчування або корму для тварин (відсутність сальмонели у 25 г зразку) необхідно 4 доби, у разі одержання росту підозрілих колоній ідентифікація продовжується до 6-7 діб.

Тож, постала проблема пошуку альтернативних методів випробувань зразків, які б дозволили отримувати достовірні результати за більш короткий термін.

Суть методу. Метод виявлення сальмонел базується на використанні аналізаторів VIDAS для процедури автоматизованого визначення сальмонел в наборі VIDAS SLM після попереднього неселективного збагачення з подальшим накопиченням бактерій в рідких селективних середовищах, виділенням бактерій, що формують типові колонії на агаризованих, диференційно-діагностичних середовищах, що мають типові для бактерій роду *Salmonella* біохімічні та серологічні властивості.

Цей метод скорочує тривалість визначення сальмонел для негативних проб до 48 годин.

Метод «VIDAS SLM» задовольняє всі вимоги, що висувуються до альтернативних методів згідно ISO 16140, а саме:

метод схвалено міжнародними органами зі стандартизації: французькою асоціацією стандартизації AFNOR, Науковою асоціацією аналітичної хімії AOAC, асоціацією стандартизації скандинавських країн NORDVAL, міністерством охорони здоров'я Канади, Німецьким інститутом стандартизації DIN;

легкість використання методу та його автоматизація: першу та другу добу проводиться неселективне та селективне накопичення. На 2 добу бульйон накопичення вноситься до стрипу тест-системи, який потім поміщають в прилад, програма дослідження обирається приладом автоматично. Три останні дії займають не більше 5 хв. Після чого проводиться аналіз, результат прилад видає за 35–45 хв;

компактність та автоматизація процесів: всі процедури імунофлуорисцентного аналізу виконуються приладом; отримані результати роздруковуються вбудованим принтером у вигляді протоколу;

економія робочого часу лікарів та лаборантів: аналіз триває 40–50 хв, одночасно можна випробовувати до 12 зразків, до того ж – економія розхідних матеріалів, поживних середовищ (у разі отримання негативного результату – не потрібно проводити посів на тверді диференційно-діагностичні середовища);

стандартизація отриманих результатів: до кожного набору тест-системи «VIDAS SLM» входять калібрувальні розчини. Калібрування приладу проводиться раз на 2 тижні. При кожному аналізі проходить автоматичний контроль терміну придатності та якості тест-систем.

Параметри, за якими проводилась валідація методу «VIDAS SLM», та результати досліджень наведено в табл. 1, 2 та 3, з яких видно, що вище описаний метод дослідження придатний до використання в повсякденній роботі бактеріологічних відділів державних лабораторій ветеринарної медицини України як скринінговий метод дослідження на наявність патогенних мікроорганізмів *Salmonella*.

Висновки

1. Сучасні технології, що застосовуються в аналізаторі VIDAS, дозволяють з високою чутливістю та специфічністю проводити ідентифікацію патогенних мікроорганізмів, в тому числі *Salmonella*, у харчових продуктах та продовольчій сировині, мінімізуючи людський фактор, виключаючи можливість перехресної контамінації проб.

2. Альтернативний метод відповідає спеціалізованим параметрам (чутливість, повторюваність, відтворюваність та специфічність – становить 100%), тому є придатним до використання в повсякденній роботі бактеріологічних відділів державних лабораторій ветеринарної медицини України як скринінговий метод дослідження на наявність сальмонел.

3. Дослідження проб методом імуноконцентрації з автоматичним визначенням бактерій роду *Salmonella* на аналізаторі VIDAS скорочує тривалість виявлення даного патогену до 48 годин при одержанні негативного результату у порівнянні із традиційним методом.

4. При отриманні ж позитивного результату дослідження слід проводити класичними мікробіологічними методами: виділити культуру, після чого провести декілька підтверджуючих тестів.

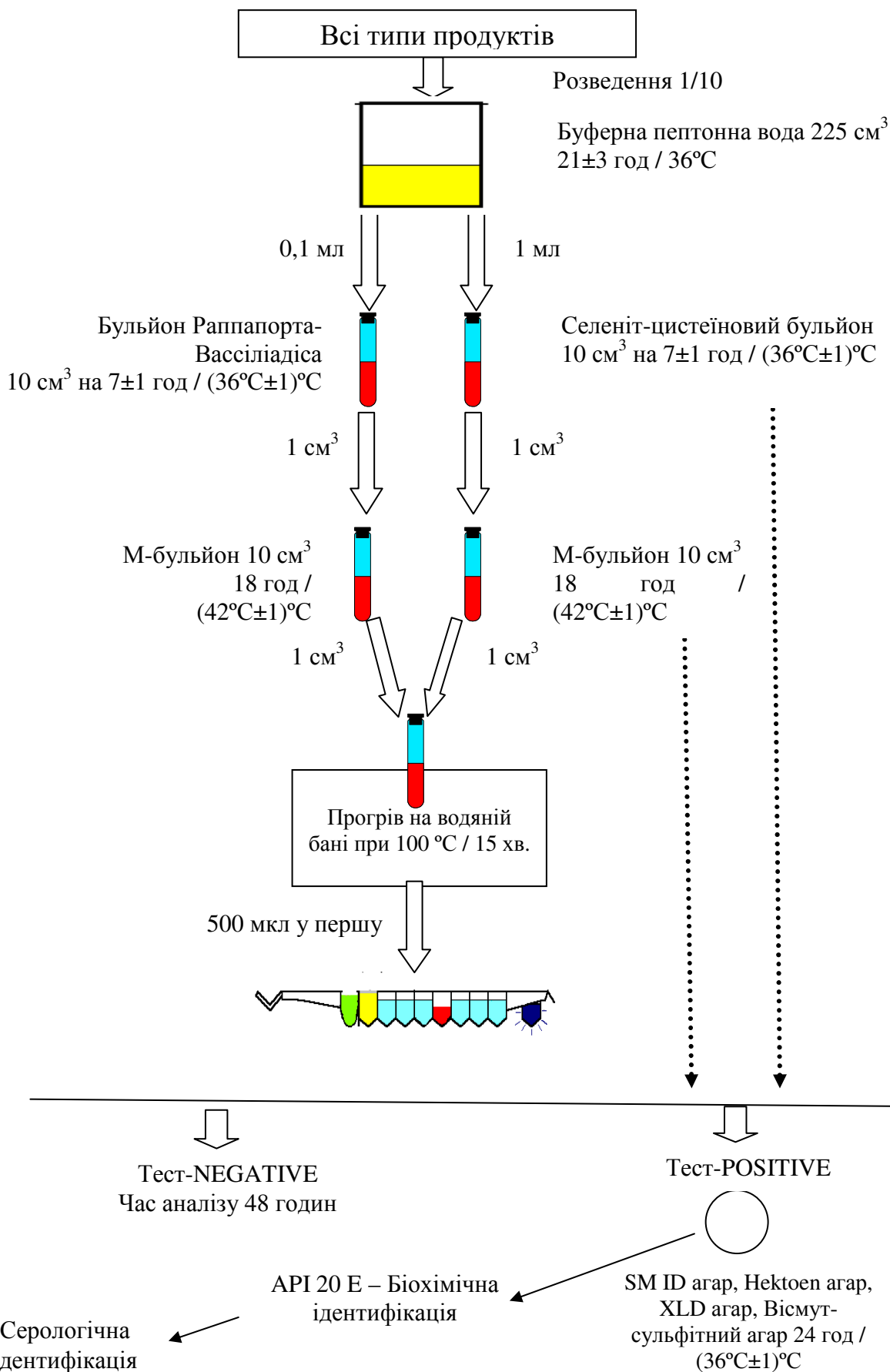


Рис. 1. Автоматизоване визначення бактерій виду *Salmonella adabraca* на аналізаторі VIDAS.

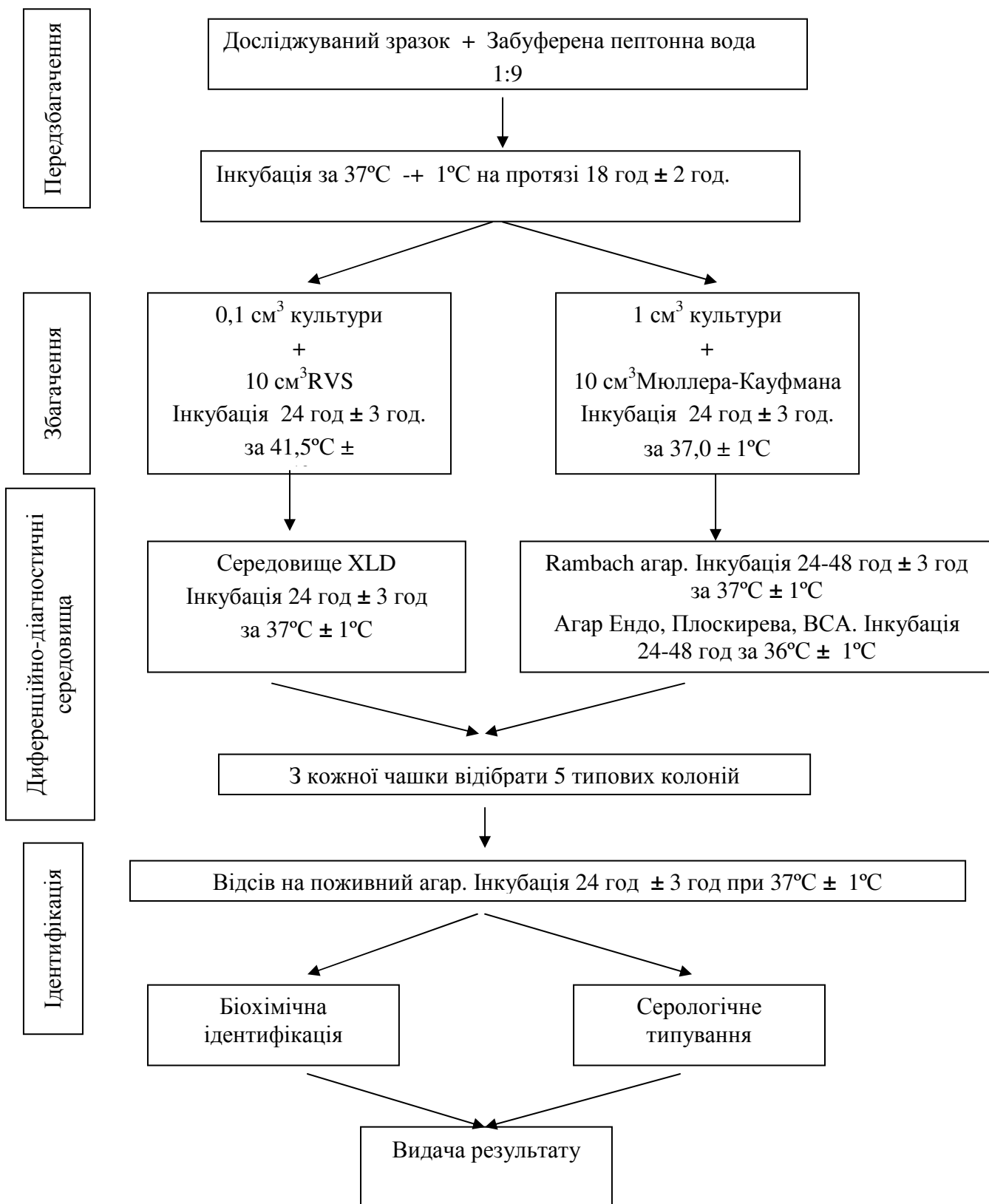


Рис. 2. Виділення бактерій виду *Salmonella adabrka* згідно ISO 6579.

Однодобова агарова культура, отримана з типових для сальмонел колоній на диференційно-діагностичних середовищах

Біохімічна ідентифікація	Реакція	
TSI глюкоза (формування кислоти) <i>Засівають штрихом</i> (37 ± 1) °C – (24 ± 3) год.	жовтий — позитивна (ферментується)	червоний— негативна (не ферментується)
TSI глюкоза (формування газу) <i>Засівають уколом</i>	бульбашки чи тріщини — утворення газу	газ не утворюється
TSI (лактоза) <i>Засівають штрихом</i>	червоний або без змін — негативна лактоза і (чи) сахароза (не ферментується)	жовтий — позитивна лактоза і (чи) сахароза (ферментується)
TSI (цукроза) <i>Засівають штрихом</i>		
TSI (водню сульфід) <i>Засівають уколом</i>	чорний — утворення сірководню (H ₂ S)	не чорний — без сірководню (H ₂ S)
Розчеплення сечовини <i>Засівають штрихом</i> (37 ± 1) °C – (24 ± 3) год.	–	зміна кольору до рожевого – до світло-вишневого
Декарбоксілювання лізину <i>Вносять культуру трохи нижче поверхні середовища</i> (37 ± 1 °C – (24 ± 3) год.	каламутність і пурпурний колір середовища	жовтий колір
Voges-Proskauer реакція <i>В 3 мл сер-ща VP</i> (37 ± 1 оC – (24 ± 3) год.	+ 2 краплі розчину креатину, 3 краплі спиртового розчину 1-нафтолу, 2 краплі розчину калію гідроксиду. <i>Струшують після додавання кожного реактиву</i>	
	–	Рожевий колір – до яскраво-червоного протягом 15 хв
Реакція з β-галактозидазою <i>паперові диски – відповідно до інструкції виробника</i>	–	+
Реакція з індолом <i>В 5 см³ триптон- триптофанового середовища (37 ± 1 оC – (24 ± 3) год.</i>	1 см ³ реагенту Ковача	
	жовто-коричневе кільце	червоного кільця



Рис. 3 Схема ідентифікації сальмонел

Таблиця 1

Валідація методу «VIDAS SLM»

Валідація для кожної з матриць: риба свіжоморожена, м'ясо свіжоморожене, молочні продукти (сир твердий), яйця курячі, комбікорм.			
Зведені результати, одержані для виготовлених зразків			
Вид зразка / ступінь контамінації саальмонелами	Кількість зразків	Кількість зразків (правильних досліджень)	Кількість зразків (неправильних досліджень)
Нульовий рівень:	5	5	0
Нульовий рівень для Salmonella (adabraka), контаміновані Enterobacter	5	5	
Низький рівень контамінації Salmonella (adabraka) (~5,0 × 10 ¹ м.т.):	5	5	0
Високий рівень контамінації Salmonella (adabraka) (~ 2,0 × 10 ³ м.т.):	5	5	0

Таблиця 2

Параметри валідації методу «VIDAS SLM» та одержані результати досліджень відносно еталонного аналітичного методу

№ з/п	Параметри методу	Встановлені значення та їх оцінка	Одержанні значення
1.	Діапазон використання методу	Виявлення Salmonella adabraca в вищезазначених матрицях	Виявлення / відсутність Salmonella adabraca
2.	Чутливість (точність для позитивних зразків)	Проби забруднені 85,9 – 100%	100%
3.	Повторюваність (внутрішньолабораторна відповідність)	Сліпий зразок 94,4%, забруднені зразки 84% - 100%	100%
4.	Відтворюваність (міжлабораторна відповідність)	Сліпий зразок 93,1%, забруднені зразки 75,2% - 100%	100%
5.	Специфічність (точність для негативних зразків)	100%	100%

Таблиця 3

Інтерпретація результатів досліджень, одержаних при проведенні валідації методу «VIDAS SLM»

		ПРАВДА		Сумма	Спосіб інтерпретирования результатів:
		+	-		
Тест	+	PA	PD	a	PA = кількість позитивних зразків, оцінених при дослідженні як позитивні ND = кількість позитивних зразків, оцінених при дослідженні як негативні NA = кількість негативних зразків, оцінених при дослідженні як негативні PD = кількість негативних зразків, оцінених при дослідженні як позитивні
	-	ND	NA	b	
Сума		N+	N+	N	

		ПРАВДА		Сумма
		+	-	
Тест	+	10	0	10
	-	0	10	10
Сумма		10	10	20

Специфічність	100,0%
---------------	--------

Чутливість	100,0%
------------	--------

Точність	100,0%
----------	--------

Для p = 95% (ISO 16140)	
Верхній	Нижній
100,0%	100,0%

100,0%	100,0%
--------	--------

100,0%	100,0%
--------	--------

Список використаної літератури

1. *Шиленко И. В.* Отечественный иммунохроматографический тест для выявления сальмонелл различных серогрупп/ И. В. Шиленко, С. П. Ярков, А. Б. Кононенко, А. В. Артемов, А. М. Смирнов // *Веткорм.* – 2011. – № 4. С. 12-13.
2. *Троцький М. С.* Сальмонельоз птахів основна причина сальмонельозу людей/ М. С. Троцький // *Тваринництво сьогодні* – 2012 – № 2. С.34 – 37.
3. *Лаптев Ю. О., Яблонський П. М.* Біобезпека та захист птиці від сальмонельозу/ О. Ю. Лаптев, П. М. Яблонський // *Тваринництво сьогодні* – 2012 – № 6. С. 60-61.
4. *Алиева Е. В.* Разработка лабораторных экспресс-методов и технологии производства иммунодиагностических препаратов для выявления возбудителей листериоза и кампилобактериоза: Автореф. дис. ...докт. мед. наук: 03.00.07// Московск. мед. ин-т – Москва, 2008. – 19 с.
5. *Олійник Л.* Фаготипування при діагностиці сальмонельозу// *Ветеринарна медицина України* – 2004–№ 1 С. 14-16

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛ «VIDAS SLM» ИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ИММУНОАНАЛИЗАТОРА «MINI VIDAS»/ Т. А. Гаркавенко, Н. Я. Мех, И. В. Семенчукова, О. Л. Кравцова, Т. А. Дяченко

В статье проанализировано выделение микроорганизмов рода *Salmonella* из пищевых продуктов и кормов эталонным аналитическим методом и альтернативным методом «VIDAS SLM». Обоснована необходимость внедрения экспресс-метода в лабораторную практику бактериологических отделов государственных лабораторий ветеринарной медицины Украины.

Ключевые слова : Salmonella, VIDAS, экспресс-метод, определение

AN ALTERNATIVE METHOD FOR RAPID DETECTION OF SALMONELLA «VIDAS SLM» FROM FOOD AND FEED USING AUTOMATED IMUNOANALIZATOR «MINI VIDAS» / T. Garkavenko, N.Mekh, I. Semenchukova, O. Kravtchova, T. Djachenko

This article describes the analysis of reference analytical method and alternative method «VIDAS SLM» for detect *Salmonella* from food and feed. The necessity of introduction of rapid methods in laboratory practice bacteriological departments of state laboratories of veterinary medicine of Ukraine.

Key words: Salmonella, VIDAS, method for rapid, detection

Рецензент – кандидат ветеринарных наук **А. О. Меженський.**

Рукопис надійшов 25. 07. 2013р