

На правах рукописи



**Маркушина 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

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 10<sup>00</sup> 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.

2008А

17994

## 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 рыбоводства;
- 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 рыбоводства 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 трупа 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; анаэрогат; центрифуги; холодильные установки; люминесцирующий микроскоп МИ - 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 раскладки референтных штаммов возбудителя ботулизма использовали среду Китта - Тароцци. Для получения матровой раскладки, 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 - 35<sup>0</sup>С, а для остальных - 26 - 28<sup>0</sup>С. Время для токсинообразования от 5 до 12 суток. Определение титра токсичности культу-

рального фильтра 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 37°С в течение 30 - 35 суток. Токсин от вегетативных клеток *Cl. botulinum* отделяли путем охлаждения в рефрижераторе (4±2)°С 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 группы 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 постоянно клинического и иммунологического статуса (РНГА, ИФА, РН).

Для изучения антигенных свойств возбудителя ботулизма готовили микробную массу. Исследуемый штамм возбудителя ботулизма засеивали на среду Китта - Тароцци с добавлением 1% глюкозы с последующей инкубацией при температуре (35±2°С). Через трое - 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 коньюгатов проверяли посевом на сахарный МПА. Посевы со всеми средами выдерживали в анаэробном состоянии при температуре ( $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ) в течение 15 суток. Питательные среды с посевами должны оставаться стерильными.

Активность иммунопероксидазных коньюгатов 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, перекадывали 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 шугтелировали 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, шуттелировали и центрифугировали при 7 - 10 тыс. об/мин. Полученный осадок по 0,2 мл заседали на среды Китта - Тароцци 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 мышцах	+	+	+	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 мышцах. 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 *Сl. 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 *Сl. 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 «Пухно» 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 Цейслера. 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 внутривенно 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 avidность 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  $10 \pm 5$  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 ( $K_{sp} = 2,7 \pm 0,2$ ), 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.

Иммунофлуоресцирующие глобулины в МФА перекрестно реагировали со штаммом 16 - Я (В) и не реагировали со штаммами 231 (С) и 153 (Е). В то же время посеvy 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 надосадов 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. Пассаж 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. Ибрагимов, В.А. Курамшина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. Том 192. - Казань, 2008, с. 49 - 53.

08-17994

2008A  
17994

---

Подписано к печати *15.11.08.*  
Заказ *302* Тираж *100* экз.  
Бумага офсетная

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

Центр информационных технологий КГАВМ  
420074, Казань, Сабирский тракт, 35.