

аэробных условий вновь происходит размножение [5]. Пассирование буркхольдерий на питательных средах, как правило, ведет к снижению вирулентности культур, чувствительность к антибактериальным средствам при этом может меняться разнонаправленно. Дальнейшие исследования по изучению корреляции вирулентности культур буркхольдерий и их устойчивости к химиопрепаратам, безусловно, интересны как со стороны понимания биологической сути патогенности микробов, так и для решения конкретных задач лечения инфекций и расшифровки эпидемиологических процессов.

Литература

1. Илюхин В.И., Алексеев В.В., Королев Ю.С. Буркхольдерии – возбудители сапа и мелиоидоза // Руководство по медицинской микробиологии, под ред. А.С. Лабинской и др., М. – 2010. – Книга 2. – С. 755-787.
2. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сеимова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2002. – № 1. – С. 7-11.
3. Brett P.F., Dezhazer D., Woods D.E. *Burkholderia thailandensis* sp. nov. a *Burkholderia pseudomallei* – like species // Intern. Bacteriol. – 1998. – Vol. 48. – P. 317-320.
4. Palleroni N.J. Family of *Pseudomonadaceae* // Bergey's manual of systematic bacteriology. – Baltimore, 1984. – Vol. 1. – P. 141-199.
5. Tandhavanant S., Thanwisai A., Limmathurotsakul D. Effect of colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* on intracellular survival and resistance to antimicrobial environments in human macrophages *in vitro* // BMC Microbiol. – 2010. – Vol. 10. – P. 303-315.

Ответственный автор

Сенина Татьяна Васильевна – старший научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 616.98:579.852.13-076

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА БОТУЛОТОКСИНА В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ МЕТОДОМ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА

Т.Ю. Загоскина¹, С.В. Балахонов¹, Е.А. Чапоргина¹, Е.Ю. Марков¹,
О.Б. Бодрых², Т.А. Иванова¹, О.В. Гаврилова¹, Т.М. Долгова¹,
Т.С. Тайкова¹, Ю.О. Попова¹, А.В. Корнева¹

¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» Роспотребнадзора, Иркутск

Разработана высокочувствительная специфичная тест-система для дот-иммуноанализа, позволяющая в течение двух часов обнаруживать ботулотоксины типов А, В, Е в клиническом материале от больных людей.

Ключевые слова: ботулинический токсин, биологическая проба, реакция биологической нейтрализации токсина, дот-иммуноанализ.

DEFINITION OF BOTULOTOXIN TYPE IN CLINICAL MATERIAL FROM PATIENTS BY DOT-IMMUNOASSAY

T.Yu. Zagoskina¹, S.V. Balakhonov¹, E.A. Chaporgina¹, E.Yu. Markov¹, O.B. Bodrykh², T.A. Ivanova¹, O.V. Gavrilova¹, T.M. Dolgova¹, T.S. Taikova¹, Yu.O. Popova¹, A.V. Korneva¹

¹Irkutsk Anti plague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk;

²Center of Hygiene and Epidemiology in Irkutsk region of Rospotrebnadzor, Irkutsk

High-sensitive, specific test-system for dot-immunoassay is developed. This method permits to reveal botulotoxins of A, B, E types within two hours in a clinical material from patients.

Key words: botulinic toxin, biological test, reaction of biological toxin neutralization, dot-immunoassay.

Ботулизм – тяжелая токсикоинфекция с высокой летальностью (35-85 %). Ботулизм встречается во всех регионах земного шара, но чаще регистрируется в странах, где население употребляет большое количество различных консервированных продуктов. Вместе с тем, ботулизм привлекает все более пристальное внимание не только как угроза для производителей продуктов питания и потребителей, но и из-за потенциальной возможности использования ботулотоксина (БТ) в качестве поражающего агента при совершении актов биологического и химического терроризма, а также как возможная причина внезапной смерти младенцев, наркоманов, принимающих внутривенные препараты.

Ботулотоксины – продукты жизнедеятельности вегетативных и споровых культур *Clostridium botulinum*, относятся к ядам биологического происхождения II группы патогенности, являются очень мощными нейротоксинами. Смертельная доза ботулотоксина для человека составляет 1 нг/кг массы тела.

Стандартным методом обнаружения ботулотоксина является биопроба на белых мышах (БП). Постановка БП является ориентировочным исследованием, чувствительность ее составляет около 30-40 пг/мл ботулотоксина [1].

Тип токсина определяется в реакции биологической нейтрализации токсина (РБНТ) на белых мышах [4]. За время исследования мыши, не защищенные тем типом антитоксина, которым вызвано заболевание у пациента, погибают. Остаются живыми лабораторные животные, которым вводили исследуемый материал в смеси с сывороткой, соответствующей типу токсина, циркулирующего в крови больного. Чувствительность РБНТ составляет около 30-40 пг/мл ботулотоксина.

В клинических микробиологических лабораториях анализ проводят с фекальными, сывороточными, желудочными, раневыми и пищевыми образцами. Однако анализ достаточно трудоёмкий и дорогой, представляет этическую дилемму из-за использования лабораторных животных. Лишь ограниченное число лабораторий за рубежом проводят биоанализ на мышах [5], несмотря на то, что он признан «золотым» стандартом детекции БТ. При подозрении на ботулизм, когда необходимо немедленное лечение, биоанализ может быть слишком медленным методом диагностики. Успех лечения больных антитоксином напрямую зависит от времени его введения: если токсин уже связался с рецепторами на поверхности пресинаптической мембраны двигательных нейронов периферической нервной системы и вызвал в нейронах протеолиз белков, входящих в состав аппарата нейроэксцитоза, то время упущено и такое лечение будет не эффективным.

В связи с этим, актуальным является развитие альтернативных методов обнаружения ботулинических токсинов. Последние успехи касаются скорости и чувствительности анализа; самые быстрые тесты сегодня выполняются за 20 минут, а ряд разработанных методов по чувствительности превосходит биопробу на мышах [5].

У нас в стране индикацию БТ проводят согласно единой схеме индикационного анализа двумя методами: постановкой реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и РБНТ. Лабораторное подтверждение может проводиться также (при наличии необходимых реагентов и оборудования) с использованием ИФА и ПЦР [4].

К сожалению, возможность проведения работ с лабораторными животными в ряде случаев ограничена, сроки получения результатов биоанализа длительны (2-8 сут). Время постановки РПГА – 2-3 часа, но чувствительность реакции составляет ~ 50 мкг/мл, что не позволяет обнаруживать невысокие концентрации токсина в образцах.

Одним из надежных экспрессных и информативных методов обнаружения ботулотоксинов *in vitro* является дот-иммуноанализ (ДИА) [2, 3]. Достаточно высокие специфичность и чувствительность, простота постановки, миниатюризация (объем пробы ~ 1 мкл), получение результатов в течение 2 ч, отсутствие потребности в дорогостоящих реактивах, оборудовании и специальной подготовке персонала делают ДИА перспективным для использования даже в лабораториях с минимальной оснащённостью.

Цель работы – конструирование тест-систем для детекции и определения типов ботулотоксина (А, В, Е) в клиническом материале от больных людей методом ДИА.

Материалы и методы

В качестве источника специфических антител использовали коммерческие поливалентные диагностические ботулинические лошадиные очищенные сыворотки против типов А, В, С, Е, F для реакции биологической нейтрализации производства НПО «Микроген» (г. Ставрополь) активностью 5000-10000 МЕ и моносpezifические ботулинические сыворотки типов А активностью 10000 МЕ, В – активностью 5000 МЕ, Е – активностью 10000 МЕ. Выбор моносpezifических сывороток обусловлен наибольшей частотой регистрации указанных типов ботулотоксина в Иркутской области.

Иммуноглобулины G (IgG) выделяли из специфических сывороток путем фракционирования каприловой кислотой и сульфатом аммония. Перед использованием полученные IgG диализовали в течение 16-18 ч против дистиллированной воды, прогревали и осветляли центрифугированием.

Золь серебра готовили путем смешивания равных объемов водных растворов боргидрида натрия и азотнокислого серебра [2]. С помощью флокуляционного теста определяли количество IgG, способных стабилизировать золь серебра. Рассчитанное количество антител (АТ) вносили в золь, перемешивали на магнитной мешалке 20 мин, затем полученный комплекс (диагностикум) стабилизировали добавлением равного объема фосфатного буфера, содержащего бычий сывороточный альбумин (БСА), нормальную кроличью сыворотку и водный раствор полиэтиленгликоля-20000. Далее в диагностикум добавляли NaCl и азид натрия и дополнительно перемешивали в течение 10 мин на магнитной мешалке.

По указанной прописи готовили диагностикумы с использованием противоботулинических IgG из поливалентной и моносpezifических каждого типа (А, В, Е) сывороток.

Постановку ДИА осуществляли в «сэндвич» варианте. При этом нитроцеллюлозные мембранные фильтры «Millipore» с размером пор 0,22 мкм персонально нагружали противоботулиническими поливалентными и моносpezifическими IgG, выдерживая их в соответствующих растворах в течение 20 мин. Далее подложки высушивали на воздухе, на каждую из них наносили исследуемый материал в объеме 1 мкл, и, после дополнительного блокирования свободных участков на мембране раствором БСА, погружали в соответствующие приготовленные моносpezifические и поливалентный диагностикумы. После часовой экспозиции и последующей промывки мембран физиологическим раствором и дистиллированной водой, образовавшийся иммунный комплекс (ботулотоксин+сpezifическое АТ, меченное коллоидным серебром) выявляли водным раствором проявителя, состоящего из лимонной кислоты, метола и азотнокислого серебра. Учет результатов – визуальный: места нанесения проб, содержащих ботулотоксин, окрашивались в виде пятен в темно-серый цвет. В отрицательных контролях и образцах, не содержащих ботулинические токсины, окрашенные пятна не формировались [2, 3].

Исследования проведены на клиническом материале (рвотные массы, промывные воды желудка, клизменные воды) от 7 больных с установленным диагнозом «ботулизм» в трех повторностях, отмечалась стопроцентная воспроизводимость результатов.

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов установлено, что в ДИА с использованием диагностикума на основе поливалентных IgG, меченных коллоидным серебром (КС) (поливалентный IgG+КС), все исследованные образцы от 7 больных были положительными, что полностью совпадало с результатами биопробы на мышах (табл. 1).

Таблица 1.

Сравнительные результаты исследования клинического материала от больных с диагнозом «ботулизм» в ДИА, РБНТ и БП

Исследуемый материал от больных	Поливалентный IgG+КС	IgG тип А+КС	IgG тип Е+КС	IgG тип В+КС	РБНТ	БП
Больной 1	1:1280	1:640	1:160	1:160	А	+
Больной 2	1:640	1:160	1:640	1:80	Е	+
Больной 3	1:640	1:80	1:640	1:80	Е	+
Больной 4	1:640	1:80	1:80	1:640	В	+
Больной 5	1:640	1:80	1:640	1:80	Е	+
Больной 6	1:640	1:80	1:160	1:640	В	+
Больной 7	1:1280	1:160	1:1280	1:160	Е	+

Примечание: В РБНТ и БП исследовался цельный материал.

При раститровке материала установлено, что у пяти больных в ДИА ботулотоксин определялся в разведении исходных образцов 1:320 – 1:640; у двух больных – в разведении 1:1280.

При исследовании клинического материала от больных в тест-системе с использованием IgG тип А+КС у одного больного ботулотоксин определялся в разведении исходного образца 1:640, при этом остальные пробы клинического материала были положительными в разведениях 1:80 – 1:160. Исследование клинических образцов в ДИА с использованием тест-системы на основе IgG тип Е+КС показало наибольшее количество положительных находок: от четырех больных в пробах обнаруживался ботулотоксин в разведениях 1:640 – 1:1280, остальные образцы были положительными в разведениях 1:80 – 1:160. В ДИА с использованием тест-системы на основе IgG тип В+КС в материале от двух больных ботулотоксин регистрировался в разведениях 1:640, остальные образцы – в разведениях 1:80 – 1:160.

В параллельных исследованиях материала в ДИА и РБНТ наблюдалось стопроцентное совпадение результатов, т.е. у одного больного был обнаружен ботулотоксин тип А, у четырех – ботулотоксин тип Е и у двух больных – ботулотоксин тип В.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о возможности использования ДИА для экспресс-детекции и типирования ботулинического токсина в клиническом материале от больных людей, что позволит повысить эффективность лабораторной диагностики ботулизма, будет способствовать более быстрой постановке диагноза и спасению больного. Разработанные тест-системы экономичны, технически просты в приготовлении, постановка ДИА легко выполнима в лабораториях инфекционных стационаров, а также в условиях работы санитарно-противоэпидемических бригад (СПЭБ) в режиме чрезвычайных ситуаций.

Литература

1. ГОСТ 10444.7-86 Продукты пищевые. Методы выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*. – М.: Стандартинформ, 2010. – 18 с.
2. Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Носырева Л.И., Бодрых О.Б., Марков Е.Ю., Вейде А.А., Долгова Т.М., Тайкова Т.С., Балахонов С.В. Конструирование тест-системы для скрининга пищевых продуктов и клинического материала на ботулотоксин в дот-иммуноанализе // Журн. инф. патол. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 20-23.
3. Носкова О.А., Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Марков Е.Ю., Лекомцева С.Е., Бодрых О.Б., Балахонов С.В. Клинико-эпидемиологические особенности и совершенствование лабораторной диагностики ботулизма в Иркутской области // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 2 (90), Ч. 1. – С. 102-106.
4. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму / Г. Г. Онищенко, Ю. М. Федоров, Н. Я. Жилина и др. – Волгоград, 2004. – С. 44-52.
5. Lindström M., Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism // Clin. Microbiol. Rev. – 2006. – Vol. 19, N. 2. – P. 298-314.

Ответственный автор

Загоскина Татьяна Юрьевна – д.м.н., зав. отделом подготовки и усовершенствования специалистов ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.
E.mail: confirk2014@mail. Тел.: (3952) 22-13-12