



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71094** (13) **U**
(51) МПК

C12N 1/02 (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

G01N 33/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 10757	(72) Винахідник(и): Фотіна Тетяна Іванівна (UA), Дворська Юлія Євгенівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.09.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2012	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Кірова, 160, м. Суми, 40021 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2012, Бюл.№ 13	

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ SALMONELLA ІЗ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТ-СИСТЕМИ RIDASCREEN®Salmonella

(57) Реферат:

Спосіб виділення мікроорганізмів роду Salmonella із харчових продуктів за допомогою тест-системи RIDASCREEN®Salmonella включає попереднє збагачення матеріалу з наступним проведенням імуноферментного аналізу. При цьому здійснюють спрощену процедуру збагачення в один крок і виявляють бактерію роду Salmonella.

UA 71094 U

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології, а саме до ветеринарної бактеріології, і може бути використана для виділення бактерій роду *Salmonella* (*S. enteritidis*, *S. typhimurium* та ін.) з харчових продуктів з метою індикації даних мікроорганізмів. Може бути використаний при проведенні ветеринарно-санітарної оцінки харчових продуктів, контамінованих збудниками сальмонельозу, з метою попередження спалахів даного захворювання у людей при вживанні забруднених продуктів харчування мікроорганізмами роду *Salmonella*.

В ветеринарній мікробіології відомі методи ізоляції бактерій роду сальмонела: метод прямого посіву на селективні поживні середовища та метод фільтрів. Метод прямого посіву на селективні поживні середовища передбачає первинні висіви проб на щільні селективні поживні середовища з додаванням суміші антибіотиків, протимікробних і фунгіцидних препаратів, які пригнічують ріст сторонньої мікрофлори. Метод фільтрів регламентує фільтрування посівного матеріалу через мембранні фільтри (по 2 пари фільтрів) з діаметром пор 0,45-0,65 мкм, через які проникають мікроорганізми роду *Salmonella* і відфільтровується стороння мікрофлора.

Посіви на диференційно-діагностичних середовищах інкубують в термостаті 18-20 год. при температурі 37 °C, після чого переглядають неозброєним оком або за допомогою лупи в прохідному денному або штучному світлі (посіви на чашках Петрі з вісмут-сульфітному агарі переглядають в прохідному світлі) і відзначають колонії, за морфологічними властивостями схожі на сальмонельозні. Підозрілі колонії (не менше трьох) пересіюють в пробірки із скошеним МПА або одним із комбінованих середовищ - Олькеницького, Кліглера, Ресселя.

У випадках надзвичайної епідемічної ситуації при наявності підозрілих колоній в посівах з продуктів і змивах паралельно з пересівом на комбіноване середовище проводять висів на МПА для подальшої постановки реакції аглютинації. Результати є орієнтовними і вимагають підтвердження на етапі завершення біохімічної ідентифікації (МУ 4.2.2723-10. Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды. Методические указания, 2010).

Відомі методи недостатньо ефективні при ізоляції сальмонел з харчових продуктів сумнівної свіжості (м'яса, молока, яєць) за рахунок того, що в матеріалі міститься домінуюча кількість сторонньої мікрофлори, а в зразках продукції, що містять залишкову кількість антибактеріальних препаратів, кількість *Salmonella* spp. досить незначна. В зв'язку з цим при виділенні мікроорганізмів роду *Salmonella* з харчових продуктів доцільно проводити збагачення матеріалу.

Згідно з процедурою стандарту ISO 6579:2002 етапи виділення включають попереднє збагачення (буферна вода, 18 годин при 37 °C), збагачення (середовище Раппапорта-Вассиляди -24 години при 41,5 °C або тетратіонатний бульон Мюллера-Кауфмана -24 години при 37 °C), виділення чистої культури (24 години) та підтвердження або застосування біохімічних або серологічних методів для ідентифікації збудника (ДСТУ ISO 6579:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Методика виявлення *Salmonella* spp (ISO 6579:2002, IDT).

При застосуванні стандартних мікробіологічних методів виділення сальмонели з харчових продуктів потрібно від 4 до 5 днів. В бактеріології відомі експрес-методи ізоляції сальмонел з патологічного матеріалу та продуктів харчування, в основі яких є імунохроматографія, імуно-ферментний аналіз та ін. Ці методи дозволяють значно скоротити термін проведення досліджень та надання результату аналізів. Головна перевага експрес-тестів в порівнянні з класичними методами аналізу - скорочення часу проведення аналізу та очікування результатів: до 2-х днів замість чотирьох.

Відомі експрес-методи виділення сальмонели компанії Singlepath та Duopath. Тест містить ряд продуктів дозволяють вручну швидко підтвердити наявність або відсутність в продуктах харчування сальмонел. Патогени виявляються через унікальну комбінацію ELISA методу імунохроматографії і появи сигналу зміни кольору. Тести містять колоїдні, мічені золотом антитіла до антигенів патогенів. Комплекс антиген-антитіло переміщається на мембрану до реакційної зони, яка містить антиген-антитіло. Створюється комплекс антиген-антитіло з утворенням яскравої червоної лінії. Тест являє собою діагностичну панель з лункою для додавання збагаченого зразка, контрольної і тестової зоною (Материалы конференции "Актуальные проблемы современной клинической лабораторной диагностики", Новосибирск, Россия, 2007).

Недоліком вищевказаних методів є те, що за їхньою допомогою можливий лише якісний аналіз на наявність сальмонел. Тобто є можливість швидко встановити наявність або відсутність сальмонели в досліджувальному матеріалі. Але останнім часом в рутинній лабораторній практиці широко застосовується більш зручний імуно-ферментний метод аналізу

(ІФА, elisa), який є офіційним методом контролю продуктів тваринного походження в країнах Євросоюзу (Директива 93/257/ЕЕС).

Відомий експрес-метод виділення сальмонели за допомогою тест-системи LOCATE Salmonella - система швидкого (протягом 48 годин) ензим-пов'язаного імуносорбентного аналізу (ELISA) для виявлення сальмонел у харчових продуктах. Культура збагачення вноситься в спеціальні мікротитраційні планшети і послідовно обробляється високо специфічним кон'югатом моноклональних антитіл і хроморогеном. Утворення пофарбованого продукту може бути виявлено візуально або за допомогою спеціального приладу (зчитувача планшет) при 450 нм (Микробиологические методы контроля пищевых продуктов по методике ISO и OXOID, Москва, 2010).

Найбільш близьким до запропонованого є метод точкової імуноферментної детекції для виявлення антигену в кількості від 10^6 до 10^9 мікробних клітин у 1 см^3 матеріалу. Методика постановки тесту проста, не вимагає спеціального обладнання і дозволяє отримати результат протягом трьох годин (Драгут С.С., 2006 -автореф. канд. диссерт., Харків - 25 с).

Однако, відомий спосіб є недостатньо зручним та ефективним для виявлення сальмонели у 25 г досліджуваного продукту, згідно з Регламентом Європейського Парламенту та Ради N 2160/2003 від 17.11.2003 про контроль вмісту сальмонели та інших визначених зоонозних збудників, що знаходяться у продуктах харчування.

В основу корисна модель поставлена задача запропонувати експрес метод виділення мікроорганізмів роду Salmonella з харчових продуктів за допомогою імуноферментного аналізу на мікропланшетах, забезпечити достовірність та ефективність досліджень, добитися збільшення частоти та зменшення часу проведення ізоляції сальмонел з харчових продуктів. При застосуванні тест-системи виявлення сальмонели, всі необхідні реагенти входять в комплект, що спрощує проведення досліджень, цей метод дозволяє виявляти 1 бактерію роду Salmonella в 25 г зразку, що відповідає 104 Salmonellae/мл відразу після збагачення.

Запропонований спосіб здійснюється таким чином (Схема виявлення сальмонел в продуктах харчування за допомогою тест-системи RIDASCREEN®Salmonella):

1. Підготовка планшетки: встановити потрібно кількість луночок в планшетку - одну лунку на одну пробу, одну - для позитивного контролю та одну - для негативного. Всі непотрібні невикористані луночки повернути в мішечок і щільно його закрити.

2. Додавання проби (зразка): використовуючи нову насадку для піпетки для кожного зразка, перенести по 100 мкл контрольних розчинів і проби - кожен у окрему луночку, записуючи номер кожного зразка. Накрити лунки покривною плівкою і інкубувати протягом 30 хвилин при $35-37 \pm 1^\circ \text{C}$.

3. Перше промивання: звільнити лунки від вмісту і промити сім разів буферним миючим розчином (300 мкл), вручну (можна використовувати багатоканальні піпетки) або за допомогою автоматичного миття для планшеток (запрограмованого для використання в цьому тесті). Ретельне промивання лунок - дуже важливий етап, який має безпосередній вплив на точну інтерпретацію результатів.

4. Збагачення: додати по 250 мкл бульйону для бактерій роду Salmonella в кожную лунку. Накрити лунки і інкубувати протягом 4 годин при $35-37 \pm 1^\circ \text{C}$. Згідно з процедурою валідації AFNOR або якщо зразок кислий чи продукує кислоту (наприклад, сире молоко) час інкубації має становити 5,5-6 годин максимум.

5. Перенесення і підтвердження: збагачений бульйон можна зберегти і залишити, якщо необхідно пряме підтвердження на селективному середовищі (не обов'язково). Перенести 100-250 мкл бульйону для бактерій роду Salmonella після інкубації в нову мікролунку, якщо потрібно, і накрити. Бульйон можна зберігати в холодильнику до 48 годин. Звільнити лунки (необов'язково: промити 3-5 разів).

6. Додавання кон'югату: переконавшись, що всі лунки порожні, перш ніж почати додавати. Додати 100 мкл кон'югату в кожную лунку. Накрити лунки і інкубувати протягом 30 хвилин при $35-37 \pm 1^\circ \text{C}$.

7. Друге промивання: звільнити лунки і промити сім разів з 300 мкл миючого буфера.

8. Додавання субстрату: перед початком потрібно переконавшись, що лунки порожні. Додайте по 100 мкл субстрату в кожную лунку. Інкубуйте протягом 15 хвилин при кімнатній температурі ($20-25^\circ \text{C}$) в темряві і відразу ж проведіть облік результатів.

9. Облік результатів: зміна кольору субстрату з червоного до блакитного припускає наявність бактерій роду Salmonella. Зміна кольору розпочнеться по краях лунок. Потрясіть акуратно мікропланшетку перед урахуванням результатів.

10. Додавання стоп-розчину: Додайте 100 мкл стоп-розчину в кожную лунку. Зміна кольору субстрату з блакитного до жовтого свідчить про наявність бактерій роду Salmonella.

11. Автоматичний облік результатів: абсорбцію зразків враховують при 450 нм і 620 нм як "reference" довжину хвилю з використанням апарата для обліку результатів на мікропланшетках.

Інтерпретація результатів - Візуальна:

5 1. Проба вважається позитивною, якщо негативний контроль прозорий або блідо-блакитний, а позитивна проба значно забарвлена; але темніша, ніж позитивний контроль.

2. Проба вважається негативною, коли негативний контроль прозорий або блідо-блакитний, а проба такого ж кольору або бліда, ніж негативний контроль.

Автоматизована:

10 1. Проба вважається позитивною, коли тест достовірний, а абсорбція зразка більше або дорівнює 0,200.

2. Проба вважається сумнівною, коли тест достовірний, і абсорбція зразка від 0,185 до 0,200.

3. Проба вважається негативною, коли тест достовірний, і абсорбція зразка менше 0,185.

15 Метод експрес-аналізу продуктів харчування за допомогою тест-системи RIDASCREEN®Salmonella є надійною, гнучкою тест-системою для виявлення рухомих і нерухомих бактерій роду Salmonella (у тому числі S. pullorum і S. gallinarum) із зразка після витримки протягом ночі на бульйоні збагачення. Він працює зі спрощеною процедурою збагачення в один крок і виявляє незначні кількості небезпечної патогену. Високо специфічні очищені антитіла на планшеті селективно вловлюють сальмонели в зразках. Відповідний

20 бульйон додається також в планшетку для швидкого зростання. Реакція завершується після додавання мічених ферментами антитіл (кон'югату), специфічних для сальмонели. Результати враховуються візуально або автоматично за допомогою приладу після добавлення стоп-розчину, який зупиняє реакцію і змінює колір розчину з блакитного на жовтий.

25 Наявність бактерій роду Salmonella підтверджується у випадку, коли пов'язаний кон'югат змінює колір субстрату до блакитного. Відсутність кольору вказує на відсутність бактерій роду Salmonella в бульйоні збагачення, а значить і в досліджуваному зразку. Всі реагенти пофарбовані в різні кольори для кращого візуального контролю за ходом дослідження.

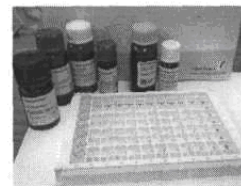
30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

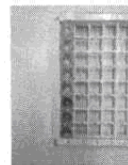
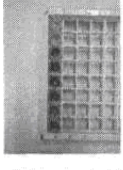
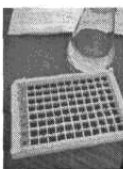
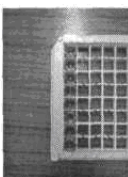
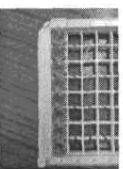
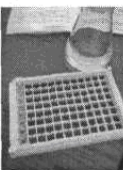
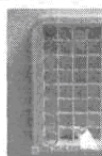
Спосіб виділення мікроорганізмів роду Salmonella із харчових продуктів за допомогою тест-системи RIDASCREEN®Salmonella, що включає попереднє збагачення матеріалу з наступним проведенням імуноферментного аналізу на мікропланшетах, який **відрізняється** тим, що

35 здійснюють спрощену процедуру збагачення в один крок і виявляють незначні кількості небезпечної патогену, що дозволяє виявити 1 бактерію роду Salmonella в 25 г зразку, що відповідає 104 бактеріям роду Salmonella/мл відразу після збагачення.

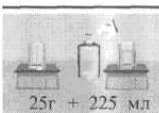
Схема виявлення сальмонел в продуктах харчування за допомогою тест –системи RIDASCREEN® *Salmonella*



Протокол



1



Збагачення

- зразок масою 25 г (мл) помістити в МПБ (1:9)
- інкубувати при $35 - 37 \pm 1^\circ\text{C}$ впродовж 16-20 годин

2



Зв'язування бактерій роду *Salmonella* зразка

- додати в лунки по 100 мкл розчинів: позитивний, негативний контроль та зразок після збагачення
- інкубувати при $35 - 37 \pm 1^\circ\text{C}$ впродовж 30 хвилин (накрити плівкою)

3



Перше промивання

- звільнити лунки від вмісту (обережно: зразки можуть містити патогенні бактерії!)
- промити 7 разів, кожен раз з 300 мкл буферного розчину

4



Вторинне збагачення бактерій роду *Salmonella* spp.

- додати 250 мкл бульйону з *Salmonella*
- інкубувати впродовж 4 годин при $35 - 37 \pm 1^\circ\text{C}$ (накрити плівкою) (5.5 годин згідно протоколу AFNOR або кислотомістять та кислотоутворюючих зразків).

5



Перенесення зразків/ Підтвердження

- зберегти бульйон збагачення з *Salmonella*, якщо необхідно пряме підтвердження позитивного результату на селективному агарі.
- звільнити лунки (або на вибор: промити 3 - 5 разів) обережно: бульйон може містити патогенні бактерії!

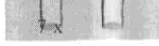
6



Додавання кон'югату

- додати 100 мкл кон'югату
- інкубувати при $35 - 37 \pm 1^\circ\text{C}$ впродовж 30 хвилин (накрити плівкою)

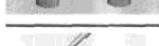
7



Друге промивання

- звільнити лунки
- промити 7 разів, використовуючи кожен раз по 300 мкл буферного розчину

8



Додавання субстрату та облік результатів

- додати 100 мкл субстрату/ хромогену
- інкубувати 15 хвилин при кімнатній температурі в темному місці
- зміна кольору з рожевого на синій свідчить про наявність *Salmonella*

9



Додавання стоп-розчину та облік результатів

- додати 100 мкл стоп-розчину
- зміна кольору з синього до жовтого свідчить про наявність *Salmonella*
- облік оптичної щільності (ОЩ) при 450/ довжина волни порівняння 620

Негативний контроль	Позитивний контроль	
< 0.150 од ОЩ	≥ 1.000 од ОЩ	
Негативний контроль	Сумнівна проба	Позитивна проба
< 0.185 од ОЩ	≥ 0.185 to < 0.200 од ОЩ	≥ 0.200 од ОЩ

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601