

О.Ю. Юрикова*, В.А. Абрамова, Р.Т. Тлеулиева, И.А. Оскольченко, Н.Н. Беляев
 Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы
 *e-mail: oksanayurikova@mail.ru

Разработка иммуноферментного метода определения стафилококкового энтеротоксина А на основе моноклональных антител в пищевых продуктах

Энтеротоксины, продуцируемые *Staphylococcus aureus*, являются причиной пищевых токсикозов. Самым распространенным из 18 известных серологических типов признан стафилококковый энтеротоксин А (SEA). Существует несколько методов детекции SEA, наиболее *высокочувствительным и специфичным* из которых является иммуноферментный анализ с применением моноклональных антител. Работа посвящена разработке метода для обнаружения SEA в пищевых продуктах на основе ингибиторного иммуноферментного анализа с использованием моноклонального антитела. Метод отработывался для продуктов, обладающих благоприятной средой для жизнедеятельности стафилококков и являющихся наиболее частой причиной стафилококковых токсикозов (молоко, сыр, колбаса, кондитерские изделия). Предел чувствительности детекции SEA с помощью данного метода составил: в сырах, кондитерских изделиях – 300 нг/мл, в молоке – 150 нг/мл и в ветчине и колбасе – 600 нг/мл.

Ключевые слова: стафилококковый энтеротоксин А, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, пищевые продукты.

O.Y. Yurikova, V.A. Abramova, R.T. Tleulieva, I.A. Oskolchenko, N.N. Belyaev

Development of immune-enzyme method for detection of staphylococcal enterotoxin A in food on the basis of monoclonal antibodies

Enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* are the reason of food poisoning. *Staphylococcal enterotoxin A (SEA)* is the most widespread toxin of 18 serological types. There are several methods of SEA detection, the most specific and high sensitive of which is Enzyme Immune Assay (EIA), based on monoclonal antibodies. Aim of this work is the development of inhibitory EIA with monoclonal antibody, obtained in our laboratory, for detection of SEA in different food samples. Debugging of the method was carried out on suitable for *Staphylococcus aureus* activity food. These kinds of food often cause staphylococcal poisoning. The thresholds of sensitivity for the method of SEA detection are 300 ng/ml (in cheeses and cakes), 150 ng/ml (in milk), 600 ng/ml (in ham and sausages).

Keywords: *Staphylococcal enterotoxin A*, monoclonal antibodies, Enzyme Immune Assay, food.

О.Ю. Юрикова, В.А. Абрамова, Р.Т. Тлеулиева, И.А. Оскольченко, Н.Н. Беляев

Моноклональдық антиденелер негізінде азық- түлік өнімдеріндегі стафилококктық энтеротоксин А-ны анықтаудың иммуноферменттік әдісін өңдеу

Staphylococcus aureus-тен өндірілген энтеротоксин, азық-түліктік уланулардың себебі болып табылады. 18 белгілі серологиялық типтердің ішіндегі ең көп таралғаны стафилококктік энтеротоксин А (SEA). SEA-ні детекциялау әдісінің бірнеше түрі белгілі, солардың ішіндегі жоғары сезімтал және спецификалығы моноклоналды антиденені қолданған иммуноферменттік талдау болып табылады. Бұл жұмыс моноклоналды антиденені қолдану арқылы ингибиторлық иммуноферменттік анализ негізінде азық-түлік өнімдеріндегі SEA-ні анықтау үшін жаңа әдісті өңдеуге арналған. Бұл әдіс стафилококктардың дамуына қолайлы болатын орталарда және стафилококктық улануға жиі себепші болатын (сүт, сыр, шұжық, кондитерлік тауарлар) азық-түліктер үшін жүргізіледі. Ағымдағы өңделген әдістің көмегімен SEA-ні детекциялаудың сезімталдық шегі: сыр, кондитерлік тауарлар үшін – 300 нг/мл; сүтте – 150 нг/мл және шошқа еті мен шұжықта – 600 нг/мл болды.

Түйінк сөздер: стафилококктік энтеротоксин А, моноклоналды антидене, иммуноферменттік анализ, азық-түлік өнімдер.

Staphylococcus aureus продуцирует стафилококковые энтеротоксины (SE), являющиеся причиной 27-45% всех пищевых отравлений. Известно 18 серологических типов SE (A-U, исключая S, F, T) [1]. SEA, SEB, SEC, SED, SEE являются причиной 95% всех пищевых стафилококковых токсикозов [2], что обусловлено устойчивостью *S. aureus* к высокому содержанию хлорида натрия (до 12%) и сахара (до 60%), а также к нагреванию (сохраняет активность при 70°C в течение 30 мин, при 80°C – 10 мин). Еще более устойчивы к нагреванию SE, окончательная инактивация которых наступает только после 2,5-3 ч кипячения.

Среди всех SE наиболее распространенным в продуктах питания считается стафилококковый энтеротоксин А (SEA) [3]. В некоторых регионах мира более 50% случаев пищевых отравлений вызвано

SEA [1]. SEA продуцируется патогенными штаммами *S. aureus*, грам-положительными, коагулазо-положительными кокками, продуцирующими термостабильную нуклеазу [4]. SEA относится к группе токсинов, вызывающих рвоту у приматов при оральном применении [4]. По химической природе SEA является пептидом с одной дисульфидной связью. SEA устойчив к химическим и физическим воздействиям [4], термоустойчив (выдерживает нагревание до 121⁰С в течение 28 минут) [5].

Определение стафилококковых энтеротоксинов в продуктах питания является важной задачей контроля качества продуктов питания и недопущения массовой вспышки заболевания. В настоящее время выделяют три группы подходов к детекции стафилококковых энтеротоксинов: культуральные методы, иммунологические методы с использованием моноклональных антител и молекулярные методы. Хотя антитела к стафилококковым энтеротоксинам могут обладать перекрестной специфичностью, методикам с использованием моноклональных антител отводится особое место в силу простоты их выполнения. В лаборатории молекулярной иммунологии и иммунобиотехнологии Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина были получены моноклональные антитела SD11 к SEA [6].

Целью данной работы была разработка на основе моноклональных антител SD11 иммуноферментной тест-системы ингибиторного типа для определения SEA в различных пищевых продуктах, пригодной для использования в практике санитарно-эпидемиологической службы и при производстве пищевых продуктов в лабораториях контроля качества.

Материалы и методы

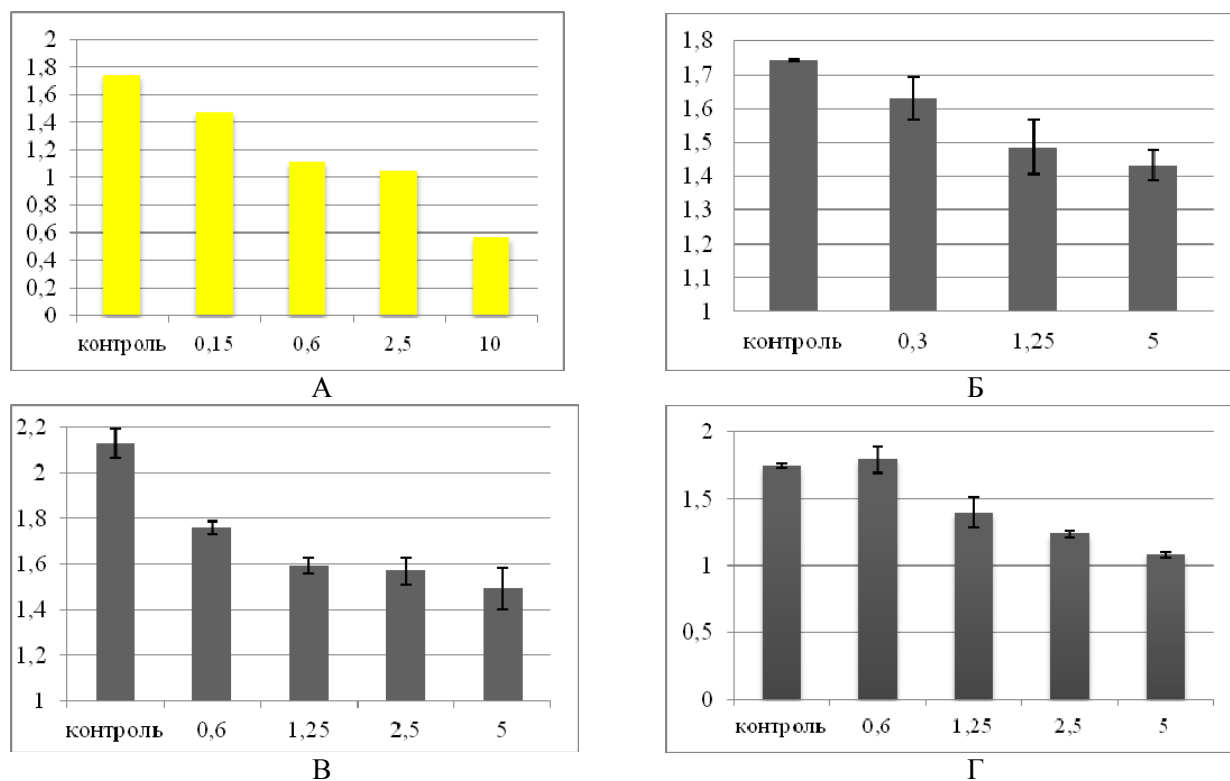
Иммуноферментный анализ. Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили, используя рекомендации [7]. 100 мкл SEA (Sigma, США) в концентрации 5 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буферном растворе (КББ) вносили в лунки полистирольных планшетов и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. В качестве блокирующего агента использовали 0,5% раствор желатина в КББ. Тестируемый материал вносили в лунки в разведениях вместе с моноклональными антителами SD11 в соотношении 1:1, разведенными в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) с 0,1% твина-20. Антивидовой пероксидазный конъюгат кроличьих антител (Ram*) (Sigma, США) вносили после трех отмывок и инкубировали 2 ч. В качестве хромогенного субстрата использовали орто-фенилендиамин (Sigma, США). Через 15-30 минут, вносили стоп-реагент (4 н H₂SO₄) и измеряли оптическую плотность продукта реакции при λ=492 нм на иммуноферментном анализаторе.

Экстракция SEA из продуктов питания. Методы детекции SEA отработывали на образцах молока, сыра, колбасы, ветчины и пирожных, реализуемых в г. Алматы. Каждый образец «заражали» различными концентрациями SEA (70 нг-20 мкг) путем нанесения водного раствора SEA на продукт с последующей инкубацией в течение 30 мин. Затем использовали следующие методы экстракции SEA из продуктов. Для экстракции SEA из молока доводили pH образца до 4,5 с помощью 1 н HCl, центрифугировали 20 мин при 10 000 об/мин. Затем pH надосадочной жидкости доводили до 7,2 с помощью 1 н NaOH и использовали для постановки ИФА. Экстракцию SEA из образца сыра проводили с помощью ФСБ (1 мл ФСБ на 1 г продукта) методом смыва при инкубации на шейкере в течение 15-20 мин. Затем центрифугировали 10 мин при температуре 15⁰С и 3500 г. Образовавшуюся после центрифугирования пленку жира механически удаляли. Полученный супернатант пропускали через нитроцеллюлозный фильтр с размером пор 0,2 мкм, используя рекомендации [8]. Зараженные образцы колбасы или ветчины гомогенизировали, добавляя ФСБ (в соотношении 1:1). Центрифугировали 20 мин при 4⁰С и 20000 г. Для освобождения от жиров полученную надосадочную жидкость пропускали через ватный фильтр. К зараженному образцу пирожного с кремом добавляли ФСБ (в соотношении 1:1), центрифугировали 20 мин при 4⁰С и 20000 г. Для избавления от жиров к 10 частям супернатанта добавляли 1 часть хлороформа, центрифугировали при том же режиме. Водную фазу, свободную от хлороформа, отбирали пипеткой и использовали для постановки ИФА. В качестве контроля использовали экстракты образцов, не зараженных SEA.

Результаты и их обсуждение

В начале работы были определены оптимальные концентрации моноклональных антител SD11 и Ram* (данные не показаны), которые составили 15 мкг/мл и 1:3000 соответственно.

Результаты исследований по всем четырем видам продуктов питания представлены на рисунке 1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предел чувствительности обнаружения SEA в молоке составляет 150 нг/мл, в сыре и кондитерских изделиях – 300 нг/мл, в колбасных изделиях 600 нг/мл.



По оси абсцисс - концентрация титруемого SEA мкг/мл, по оси ординат – оптическая плотность при 492 нм
Рисунок 1 – Результаты ингибиторного ИФА SEA в молоке (А), сыре (Б), колбасных изделиях (В), кондитерских изделиях (Г)

Таким образом, нами разработан иммуноферментный метод детекции SEA в некоторых продуктах питания на основе моноклональных антител SD11, а также отработаны методы экстракции SEA из пищевых продуктов. Данный метод может быть заложен в основу разработки тест-системы, пригодной для применения в практике санитарно-эпидемиологической службы и при производстве пищевых продуктов в лабораториях контроля качества.

Литература

- 1 Imani Fooladi A.A., Tavakoli H.R., Naderi A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products // Iran. J. Microbiol. - 2010. – N 3. – P. 135-140.
- 2 Флуер Ф.С. Стафилококковые энтеротоксины, их свойства и роль в качестве факторов патогенности // Ж. микробиол. – 2012. - № 2. – С. 99-108.
- 3 Rasooly L., Rose N.R., Shan D.B., Rasooly A. In vitro assay of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A // Appl. Environm. Microbiol. – 1997. – N 6. – P. 2361-2365.
- 4 Vasconcelos N.G., da Cunha M.L.R.S. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods // J. Publ. Health Epidemiol. – 2010. – V. 2(3). – P. 29-42.
- 5 Ral V.L.M. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk //Veterinary Microbiol. –2008. – N132. – P.408-413.
- 6 Глеулиева Р.Т., Синенко С.А., Беляев Н.Н. Моноклональные антитела к стафилококковому энтеротоксину А и иммуноферментные тест-системы на их основе // Ж. Микробиол. – 1997. - № 3. – С. 110-111.
- 7 Кэйти Д., Ранкундалия Ч. Иммуноферментный анализ. Антитела. Методы. Кн. 2. – М., 1991.
- 8 Tasci F., Sahindokuyucu F., Ozturk D. Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province // African J. Agricult. Res. – 2011. – V. 6(4). – P. 937-942.