

УДК 619:579

**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
И ОБОСНОВАНИЕ ЕГО РАЗРАБОТКИ ДЛЯ AEROMONAS HYDROPHILA
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY
AND SUBSTANTIATION OF ITS WORKING OUT FOR AEROMONAS
HYDROPHILA**

**И.Г. Горшков, Т.И. Канаева
I.G. Gorshkov, T.I. Kanaeva**

**Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и
биотехнологии Ульяновской ГСХА
The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture**

The main idea of this article is a necessity of creation of Test-system ELISA, for relief of methodic.

Aeromonas hydrophila - факультативная анаэробная грамотрицательная палочка с округленным концом, диаметр бактерии от 0,3 до 1 мкм и 1-3,5 мкм в длину, встречаются одиночно, парами или в короткой цепи (2).

A. hydrophila – распространенная бактерия, её можно легко обнаружить в стоячей, проточной, водопроводной и морской воде и почве, она была обнаружена во всех частях света. *A. hydrophila* также встречается в молоке и продуктах его переработки, мясопродуктах, рыбе и других морепродуктах (1).

Но данных о частоте обнаружении в продуктах санитарного контроля *Aeromonas hydrophila* на территории России нет, несмотря на, то что, роль *Aeromonas hydrophila* в возникновении пищевой инфекции уже доказана. Есть данные, говорящие о том, что микроорганизм является достаточно частой причиной острых кишечных заболеваний, в том числе и эпидемических вспышек среди людей. В связи с этим в 1986 году, во время работы 14-го Международного конгресса микробиологов в Манчестере было проведено специальное рабочее совещание по проблеме аэромонадной инфекции (1).

Методы диагностики *Aeromonas hydrophila*, предлагаемые в различных методиках, требуют большого количества реактивов и продолжительны по времени (выращивание на селективных средах и постановка биохимических тестов).

Одним из наиболее часто используемых методов в микробиологии является в настоящее время иммуноферментный анализ (далее ИФА), в котором ферменты выступают в качестве неотъемлемого компонента тест-системы.

Сущность ИФА заключается в специфическом взаимодействии антитела и антигена с последующим присоединением к полученному комплексу конъюгата (антивидавого иммуноглобулина, меченого ферментом). Фермент вызывает разложение хромоген-субстрата с образованием окрашенного продукта, который выявляется визуально либо фотометрически (3).

Существует множество вариантов постановки ИФА, из которых наибольшее практическое значение получил гетерогенный твердофазный иммуноферментный анализ. Использование твердой фазы позволяет упростить процесс разделения компонентов реакции за счет иммобилизации одного из компонентов на твердой фазе и удаления субстанций, не участвующих в реакции.

Самым распространенным способом иммобилизации антител или антигенов является адсорбция - процесс, при котором часть молекул за счет ионных и гидрофобных взаимодействий, а также с помощью образования водородных связей присоединяется к поверхности твердой фазы. В качестве твердой фазы в большинстве

коммерческих диагностических наборов используют полистироловые планшеты или полистироловые шарики.

Для ферментативной метки конъюгата могут быть применены разнообразные ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, глюкозооксидаза.

Широкое использование стандартной конфигурации 96-луночного планшета позволило унифицировать оборудование, необходимое для проведения иммуноферментного анализа. Принципиальная схема иммуноферментного анализа состоит из нескольких стадий.

Стадия 1. Специфические антигены пришиты к пластику лунок планшета. В лунку добавляется исследуемая сыворотка, и если в ней есть антитела (эти антитела называются первыми) к данным антигенам, во время инкубации происходит взаимоузнавание, в результате которого образуется принципиально значимая связь антиген/антитело.

Стадия 2. После отмывки лунок от несвязавшихся (а значит неспецифичных) субстанций в каждую лунку добавляются так называемые вторые антитела. Они узнают человеческие антитела определенного типа (IqA, IqG, IqM). К этим вторым антителам химически пришит активный фермент. Такое комплексное соединение называется конъюгат. Во время инкубации происходит взаимоузнавание первых и вторых антител, в результате чего в лунке образуется структура типа «сэндвич».

Стадия 3. После отмывки несвязавшегося конъюгата в лунку добавляется бесцветный субстрат, на который действует фермент. В результате субстрат превращается в окрашенный продукт. Количество окрашенного продукта измеряется на фотометре при определенной длине волны.

Таким образом, количество цветного продукта прямо пропорционально количеству фермента в лунке, а, значит, и количеству конъюгата в «сэндвиче». Количество конъюгата прямо пропорционально тому количеству комплекса антиген - антитело, которое получается на стадии 1 ИФА. Следовательно, измерение разившейся цветной реакции на стадии 3 точно коррелирует с наличием специфических антител в анализируемой сыворотке. Время проведения анализа от 1-го до 3-х часов (4).

Для облегчения методики диагностики *Aeromonas hydrophila* следует разработать тест систему ИФА, что позволит ускорить процесс идентификации бактерии, как из проб продуктов питания, так и из проб, полученных от инфицированных (контаминированных) животных. Также метод ИФА позволит проводить одновременное исследование (испытание) сразу нескольких проб (образцов).

Литература

1. Канаева Т.И. Разработка методов выделения и идентификации бактерии *Aeromonas hydrophila*. // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Саратов, 2009.
2. Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997.
3. Новые методы иммуноанализа. М., 1991.
4. Knut Karst. Vorkommen von vermehrungsfahigen *Aeromonas*arten in Rohrinkrustationen eines staedtischen Wasserversordnungssystems. //Dissertation zur Erlangung des Doctorgrades der Zahnmedizin des Fachbereichs Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe Universitaet Frankfurt am Main, 2001. – С. 8-11.