

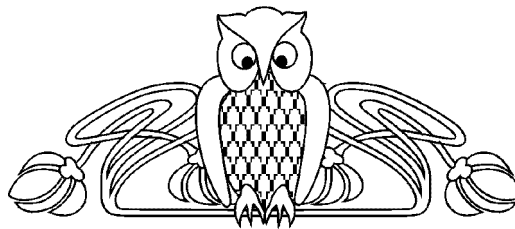


УДК 579.23:53.086:615.281

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Д. В. Уткин, В. Г. Германчук, П. С. Ерохин,
А. Н. Спицын, С. А. Щербакова, А. Н. Глазков

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб», Саратов
E-mail: rusrap1@microbe.ru



В статье представлены данные о разработке нового инструментального и методического подхода к индикации возбудителей особо опасных инфекционных болезней на основе спектрометрического анализа. Разработано устройство для детекции указанных возбудителей и программа для учета и анализа результатов. Устройство позволяет осуществлять неспецифическую и специфическую индикацию патогенов в течение 30 мин.

Ключевые слова: патогенные биологические агенты, индикация, спектрометрия.

Using of Method Spectrometric Analysis for Detection Microorganisms

D. V. Utkin, V. G. Germanchuk, P. S. Erokhin,
A. N. Spitsyn, S. A. Scherbakova, A. N. Glazkov

This article presents data on the development of a new tool and method for detection of dangerous infectious diseases agents, which is based on spectrometric analysis. A device for detection of mentioned agents and software for analysis of results have been developed. This device allows to carry out non-specific and specific detection of pathogens with 30 minutes.

Key words: pathogenic biological agents, detection, spectrometry.

Введение

Методы спектрофотометрического анализа широко используются для исследования физических и физико-химических свойств биологических объектов [1]. Регистрируемые спектральные характеристики дают информацию о качественном и количественном составе биологической системы. Применение методов спектрофотометрического анализа давно практикуется в медицинских и биологических лабораториях для определения концентрации про- и эукариотических клеток в среде, белков, нуклеиновых кислот, определения степени их чистоты. Спектрофотометрический анализ микробиологических объектов имеет свои особенности. Оптическая плотность взвеси микроорганизмов обусловлена поглощением света биологическими молекулами (белками, ну-

клеиновыми кислотами, липополисахаридами), входящими в состав клеток, и светорассеянием клеток в видимом диапазоне. Определение пиков поглощения в ультрафиолетовом (УФ) диапазоне свидетельствует о наличии в исследуемом материале белковых молекул, содержащих ароматические аминокислоты (триптофан, тирозин, фенилаланин), нуклеиновых кислот. Поглощение света компонентами клеток при длине волны 500–650 нм практически отсутствует, и оптическая плотность суспензии клеток обусловлена только светорассеянием. Оптическая плотность, измеренная в данном диапазоне, отражает концентрацию клеток микроорганизмов в суспензии. Выявление клеток микроорганизмов и определение их количества в исследуемом материале широко применяется в санитарно-гигиенических лабораториях при определении обсемененности объектов окружающей среды, пищевых продуктов. Обнаружение микроорганизмов традиционными методами занимает от 3–4 ч до 18–24 ч [2]. Методы спектрофотометрического анализа позволяют без учета этапа пробоподготовки выявлять клетки микроорганизмов в течение нескольких минут.

Целью данной работы стало применение методов спектрофотометрического анализа для выявления микроорганизмов.

1. Материалы и методы

В работе использовали штаммы микроорганизмов *Yersinia spp.*, *Bacillus spp.*, *Francisella spp.*, *Brucella spp.*, выращенные при температуре 37°C на твердых питательных средах в течение 48 ч и обеззараженные в соответствии с СП 1.3.1285-03 [3]. В качестве специфических иммунореагентов применяли «Иммуноглобулины диагностические чумные адсорбированные лошадиные для реакции агглютинации на стекле» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»).



В качестве образцов сравнения использовали стандартные белки: бычий сывороточный альбумин, белок *A Staphylococcus aureus* (Sigma, США) и полистироловые микросферы (Bio-Rad, США).

Измерение спектра поглощения проводили с использованием оптоволоконного спектрометра HR-4000 (Ocean Optics, США) в диапазоне длин волн от 200 до 1100 нм. Учет и анализ результатов осуществляли с помощью программного обеспечения SpectraSuite (Ocean Optics, США).

2. Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что спектр поглощения суспензии клеток микроорганизмов имел максимум поглощения в ближней УФ области, обусловленный наличием белковых молекул; пик в инфракрасной области, обусловленный присутствием углеводов. В диапазоне от 400 до 900 нм спектр поглощения напрямую зависел от концентрации клеток микроорганизмов в суспензии. Для определения концентрации клеток были построены калибровочные кривые для каждого вида микроорганизмов.

Спектр поглощения растворов стандартных белков имел максимум поглощения в УФ области и отсутствие светорассеяния в видимом диапазоне. Увеличение концентрации белковых растворов приводило к увеличению интенсивности пика поглощения в УФ области, в то время как у клеточных суспензий повышалось и светорассеяние. У суспензии полистироловых микросфер, напротив, отсутствовало поглощение в УФ области, но наблюдалось светорассеяние в видимом диапазоне.

Нами была разработана программа по учету и анализу результатов [4] (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2011619582). Программа позволяла анализировать спектры поглощения растворимых веществ, дисперсных частиц, клеток микроорганизмов, сравнивать их с хранящими в базе спектрами микроорганизмов и калибровочными кривыми. С помощью данной программы можно дифференцировать клетки микроорганизмов от частиц небиологического происхождения или неклеточных биологических веществ (белков, токсинов).

На втором этапе исследований были определены спектральные характеристики смеси

компонентов иммунологических реакций: клеток микроорганизмов (антигенов) и специфических антител (иммуноглобулинов). Установлено, что при инкубации клеток микроорганизмов со специфическими антителами в течение 10–30 мин спектр поглощения смеси отличался от суммы спектров поглощения компонентов смеси (клеток и антител), измеренных по отдельности. Это свидетельствует о наличии взаимодействия между компонентами, составляющими смесь. В свою очередь, при инкубации микроорганизмов с гетерологичными антителами спектральные характеристики смеси сохранялись в течение одного и более часа и являлись суммой спектров поглощения суспензии клеток и раствора иммуноглобулинов. Выявление изменений в спектрах поглощения клеток до инкубации со специфическими антителами и после было включено в алгоритм программы по учету и анализу результатов.

Выводы

Таким образом, методы спектрофотометрического анализа могут быть использованы для выявления микроорганизмов в объектах окружающей среды, дифференциации от небиологических частиц или растворов биологических веществ. Следует отметить, что методам спектрофотометрического измерения должны предшествовать этапы пробоподготовки: концентрирование, очистка и фильтрация материала.

Работа выполнена по Государственному контракту № 72-Д от 25.07.2011 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

Список литературы

1. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. М. : Техносфера, 2007. 368 с.
2. Специфическая индикация патогенных биологических агентов : практическое руководство / под ред. Г. Г. Онищенко. М. : ЗАО «МПГигиена», 2006. 288 с.
3. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1285-03 // Бюл. норматив. док. госсанэпиднадзора. 2003. № 3 (13). С. 66–144.
4. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2011619582.