

И.В.Шиленко, С.П.Ярков, Е.К.Шаулина, А.А.Титов, А.Н.Бровкина, Е.Н.Храмов

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИАНАЛИТНОГО ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ТОКСИНОВ

*ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения»,
Москва, Российская Федерация*

Целью работы было создание иммунохроматографического устройства для индикации пяти видов токсинов в едином цикле анализа и изучение его возможностей при анализе смывов с объектов окружающей среды и в продуктах питания. Были получены конъюгаты моноклональных антител с наночастицами коллоидного золота и сформированы мембранные композиты для осуществления иммунохроматографии в «сэндвич-формате» для индивидуальных токсинов. На основе полученных индивидуальных тестов было сконструировано иммунохроматографическое устройство для осуществления мультианализа, содержащее в своем составе мультианалитный индикаторный элемент, тампон для смыва пробы с поверхностей и емкость с буфером анализа. Разработанное мультианалитное иммунохроматографическое устройство позволяет определять в едином цикле анализа ботулинические токсины типов А и В в концентрации 5 и 10 нг/мл соответственно, стафилококковый энтеротоксин типа В – 40 нг/мл, холерный экзотоксин – 500 нг/мл, рицин – 80 нг/мл. Показана возможность индикации токсинов в смывах с поверхности объектов окружающей среды, а также в продуктах питания. Описана предварительная подготовка проб продуктов питания к анализу.

Ключевые слова: мультианалитная иммунохроматография, токсины.

I.V.Shilenko, S.P.Yarkov, E.K.Shaulina, A.A.Titov, A.N.Brovkina, E.N.Khramov

Development of Multi-Analytical Immune-Chromatographic Device for Toxin Indication

State Research Institute of Biological Engineering, Moscow, Russian Federation

Objective of the work was to construct immune-chromatographic device for indication of five toxin types in a single processing cycle and investigation of its capacities regarding environment sample analysis and food testing. Obtained were the conjugates of monoclonal antibodies with nano-particles of colloid gold, formed were membrane composites for sandwich immune-chromatography of separate toxins. On the basis of distinct test panels designed was immune-chromatographic device for multiple analyses, which contained multi-analytical detection element, swab for surface sampling, and storage vessel with test buffer. This device allowed for concurrent identification of botulinic toxins A, B types concentrated up to 5 and 10 ng/ml, respectively; staphylococcal toxin B type – 40 ng/ml, cholera toxin – 500 ng/ml, and ricin – 80 ng/ml, within a single processing cycle. Demonstrated was the possibility of toxin detection in washings from ambient object surfaces, as well as in foodstuffs. Described was preliminary food sample preparation procedure.

Key words: multi-analytical immune-chromatography, toxins.

Определение биологических токсинов в объектах окружающей среды имеет важное прикладное значение. Индикация токсинов актуальна при ликвидации последствий террористических актов с использованием патогенных микроорганизмов и их токсинов. Индикация токсинов в продуктах питания позволяет контролировать гигиенические показатели в процессе их изготовления и хранения. Иммунохроматографические тесты можно рассматривать как экспресс-метод индикации токсинов [1]. Несомненными преимуществами иммунохроматографических тестов являются проведение анализа в одну стадию, чувствительность в диапазоне от единиц до десятков нг/мл, быстрое действие и возможность визуальной регистрации результатов анализа. Современной тенденцией в технике иммунохимического анализа, в целом, и иммунохроматографии, в частности, является развитие мультианалитного анализа, позволяющего в едином цикле определять два и более анализируемых вещества, что еще в большей степени подчеркивает достоинства метода [5].

Ранее нами был разработан мультианалитный

иммунохроматографический тест для определения ботулинических токсинов типов А и В, в котором аналитические зоны теста располагались на одной тест-полоске последовательно [2, 3]. Физические размеры теста и аппаратура для нанесения антител ограничивают возможность получения большого количества аналитических зон в виде полосок, как это было показано при определении микотоксинов [5]. Альтернативой является формирование аналитических зон иммунохроматографического теста в виде рядов точек на одной иммунохроматографической мембране, однако изготовление такого теста требует специальной аппаратуры для микродозирования, а корректная регистрация результатов анализа – применения приборов [6].

Продуктивным подходом мультианализа является объединение нескольких иммунохроматографических моноаналитных тестов в единой оправе с возможностью равномерного распределения жидкого анализируемого образца. Подобный подход позволяет определять пять и более аналитов в едином цикле, сохраняя все достоинства иммунохроматографии.

В настоящей работе исследованы аналитические характеристики созданного мультианалитного иммунохроматографического устройства (МИУ), позволяющего определять в едином цикле анализа ботулинические токсины типов А и В, стафилококковый энтеротоксин типа В, холерный экзотоксин, рицин. Исследована чувствительность разработанного МИУ при искусственной контаминации токсинами поверхностей и продуктов питания.

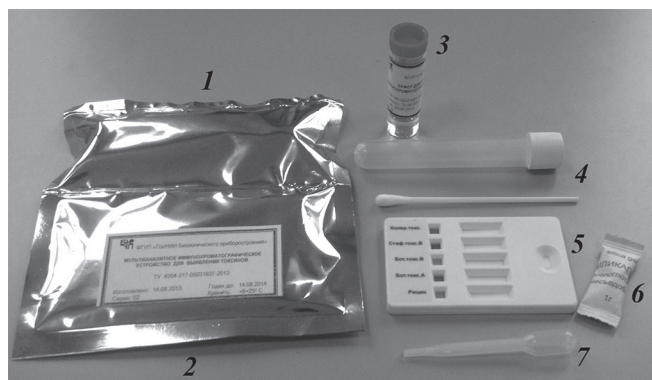
Материалы и методы

Для изготовления иммунохроматографических тестов использовали аналитические нитроцеллюлозные мембраны, а также другие мембранные материалы фирмы Millipore (США). Наночастицы коллоидного золота (НКЗ), полученные цитратным методом, конъюгировали с моноклональными антителами (МКА) против токсинов. Подробно процедура изготовления иммунохроматографических тестов, состав используемых буферных растворов и процедура регистрации результатов анализа описаны в работе [2]. Формировали полоски мультимембранного композита, состоящие из подложки для нанесения жидкого образца, подложки с конъюгатом, аналитической мембраны, на которой нанесена одна аналитическая и контрольная зоны, и подложки для впитывания жидкости. В аналитической зоне находятся МКА к аналиту, а в контрольной – кроличьи иммуноглобулины против иммуноглобулинов мыши, либо иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов кролика.

Моноаналитные иммунохроматографические тесты представляют собой одну полоску мультимембранного композита, помещенную в пластиковую оправу, снабженную отверстиями для нанесения образца и наблюдения результатов анализа.

Для получения мультианалитных иммунохроматографических тестов полоски мультимембранного композита укладывали в специальную оправу, разработанную для МИУ (ИП «Попов», Россия), рассчитанную на пять полосок мультимембранного композита (рисунок, поз. 5) с единым отверстием для нанесения образца. Каждое отверстие для наблюдения результатов анализа маркировалось надписями в верхней части оправы и отличалось цветографическим кодом. Регистрация результатов анализа осуществлялась визуально, по появлению (отсутствию) окрашенных в вишневый цвет полос в аналитической и контрольной зонах теста.

Для получения иммунохроматографических тестов применяли МКА клоны RA999 и RB999 к А- и В-цепям рицина соответственно, ВТА151 и ВТА232 к ботулиническим токсинам типа А, ВТВ224 и КВВ18 к ботулиническим токсинам типа В, S222 и S643 к стафилококковому энтеротоксину типа В, кроличьи антитела к иммуноглобулинам мыши, козы антитела к иммуноглобулинам кролика. В иммунохроматографическом тесте для индикации холерного экзотоксина использовали кроличью антисыворотку к холер-



Внешний вид и состав мультианалитного иммунохроматографического устройства для выявления токсинов:

1 – отделение упаковки, содержащее средства подготовки пробы к анализу и ее нанесения на индикаторный элемент, 2 – отделение упаковки, содержащее мультианалитный индикаторный элемент, 3 – буфер для проведения иммунохроматографического анализа, 4 – стерильный тампон в упаковке, 5 – мультианалитный индикаторный элемент, 6 – осушитель, 7 – одноразовая пластиковая пастеровская пипетка

ному экзотоксину (Sigma, С3062).

В экспериментах по определению чувствительности иммунохроматографических тестов использовали паспортизованные препараты очищенных ботулинических анатоксинов типа А и В («НПО «Микроген»), вакцину холерную бивалентную химическую (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», рег. уд. ЛС № Р N001465/01-220708), препарат стафилококкового энтеротоксина типа В, полученный из ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, препарат рицина, выделенный и очищенный из бобов клешевины, произрастающей в Краснодарском крае (ФГУП «ГосНИИОХТ»). Для приготовления образцов применяли буфер для проведения иммунохроматографического анализа производства ФГУП «ГосНИИБП» (далее – буфер анализа).

Твердые поверхности искусственно контаминировали растворами токсинов (анатоксинов) с помощью ручного пульверизатора и давали высохнуть при комнатной температуре. Сбор токсинов с поверхности осуществляли путем протирания тампоном из нетканого материала, увлажненным буфером анализа, 100 см² поверхности и последующего споласкивания тампона в 2,0 мл буфера анализа. Полученный смыв использовали для внесения в моно- и мультианалитные тесты.

Для изучения возможности выявления токсинов в продуктах питания иммунохроматографическим методом искусственно контаминировали продукты питания токсинами (анатоксинами), добываясь гомогенного распределения в объеме. Для этого на 1 г измельченного образца твердого продукта добавляли 4 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,8, и токсины (анатоксины) из расчета 0,1–50,0 мкг/г смеси. В консервированные продукты и молоко вносили известные количества ботулинических анатоксинов типов А и В, либо стафилококковый энтеротоксин типа В. Этот же энтеротоксин вносили в сливочный крем и измельченный сыр. Холерный экзотоксин добавляли

в молоко и рыбный фарш. В качестве контроля использовали те же продукты питания, не содержащие токсины (анатоксины).

Подготовку продуктов питания к иммунохроматографическому анализу осуществляли следующим образом. К 1 мл молока добавляли 5 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,4. Доводили 1 М раствором соляной кислоты до рН 4,5 и тщательно перемешивали. Для контроля рН использовали индикаторные бумаги. Смесь центрифугировали 30 мин при 7000 g при температуре 10–15 °С. Из супернатанта отбирали средний слой жидкости, не захватывая слой жира.

Навеску 5 г подготовленных, как это описано выше, контаминированных мясных, рыбных и овощных консервов, рыбного фарша, сыра и сливочного крема обрабатывали в полости излучателя ультразвукового дезинтегратора Labsonic-2000 (В. Braun, Германия) в течение 60 с при значении мощности «High», затем добавляли приблизительно 1,4 мл раствора 1 М HCl до достижения рН 4,5. Центрифугировали при 7000 g в течение 30 мин при температуре 10–15 °С. Из супернатанта отбирали средний слой жидкости, не захватывая слой жира.

Далее в чистую пробирку вносили 1,0 мл отобранной из супернатанта жидкости, добавляли к ней 20 мкл 20 % раствора Твин-20 и 1 мл буфера анализа, перемешивали, доводили рН до 7,5–8,0 раствором 1 М NaOH. Полученную жидкость использовали для нанесения на иммунохроматографические тесты.

Результаты и обсуждение

Внешний вид и состав МИУ приведен на рисунке. Газонепроницаемая полимерная упаковка разделена на 2 отсека, в одном – находится мультианалитный иммунохроматографический тест и пастеровская пластиковая пипетка, пакет с силикагелевым осушителем, в другом – стерильный тампон, пробирка с буфером анализа. В таком варианте МИУ может быть использовано для взятия мазков с поверхности объектов окружающей среды оператором и проведения индикации по пяти токсинам. Удобная компактная аналитическая система МИУ может рассматриваться как индивидуальное средство контроля биологической обстановки. Масса МИУ в упаковке составляет 32,0 г, срок хранения при температуре 10–25 °С не

менее года. Допускается однократное замораживание до –70 °С, без утраты индикационных свойств. Чувствительность индикации в растворе составила: 5 нг/мл для ботулинического токсина типа А, 10 нг/мл для ботулинического токсина типа В, 40 нг/мл для стафилококкового энтеротоксина типа В, 500 нг/мл для холерного экзотоксина и 80 нг/мл для рицина. МИУ были специфичны по отношению к токсинам, которые они определяют, а также к столбнячному, дифтерийному и ботулиническому анатоксину типа Е, взятым в концентрации 5,0 мкг/мл. При индикации токсинов в смывах с поверхностей МИУ показали следующие значения: ботулинические анатоксины типов А и В индицируются при поверхностной плотности контаминации 0,6 и 0,4 нг/см² соответственно, а холерный эндотоксин – 40,0 нг/см². При этом чувствительность индикации практически не зависела от природы загрязненной токсинами поверхности – ламинированной древесно-стружечной плиты, фаянса, окрашенного металла или линолеума. Необходимо отметить, что присутствие почвенной пыли в образцах до концентрации 1,0 мг/мл не давало ложноположительных результатов, а присутствие бытовой (комнатной) пыли в анализируемых образцах не давало ложноположительных результатов до концентрации 10,0 мг/мл.

Основные результаты индикации с помощью МИУ токсинов в продуктах питания приведены в таблице. Видно, что процедура пробоподготовки снижает чувствительность индикации в продуктах питания, по сравнению с чистыми растворами токсинов, в 20–100 раз. Тем не менее иммунохроматографический метод может быть применен для экспресс-индикации токсинов, особенно в случаях, когда объем исходного образца достаточен для получения репрезентативной пробы, содержащей значительное количество токсина. При выявлении токсинов с помощью иммунохроматографии весьма велико влияние матрикса вещества, в котором он находится. Большую роль играет наличие сильных электролитов, жиров, рН среды и ее вязкость. Перечисленные факторы могут снизить эффективность иммунохимического взаимодействия (чувствительность теста), либо привести к ложноположительным результатам. Особенно это справедливо по отношению к продуктам питания, которые содержат такие биополимеры,

Чувствительность выявления токсинов в продуктах питания с помощью МИУ

Наименование продукта питания	Чувствительность выявления, мкг/г			
	Ботулинический анатоксин типа А	Ботулинический анатоксин типа В	Стафилококковый энтеротоксин типа В	Холерный экзотоксин
Молоко 2,5 % жирности	0,6	0,6	1,2	10,0
Говядина тушеная консервированная ГОСТ 54033-2010	0,1	0,5	2,0	-
Сайра тихоокеанская натуральная с добавлением масла ГОСТ 13865-2000	0,5	0,7	2,0	-
Горошек зеленый консервированный	0,5	5,0	10,0	-
Сливочный крем, содержащий сливочное масло и консервированное сгущенное молоко	-	-	10,0	-
Сыр твердый	-	-	2,0	-
Фарш из пресноводной рыбы	-	-	-	20,0

как белки, сахара, клетчатку, жиры, а также красители и консерванты, поваренную соль, бензоат натрия, другие вещества. Примененная нами схема пробоподготовки была направлена на полноценную экстракцию токсинов в жидкую фазу, понижение вязкости образца, уменьшение содержания жира, солей и твердых частиц в обработанном образце продуктов питания и поддержания уровня pH, при котором иммунохроматографический процесс был эффективен. Нами не наблюдалось ложноположительных результатов ни для одного из токсинов после осуществления пробоподготовки. Общее время подготовки проб продуктов питания к анализу составляло 35–40 мин, длительность самого иммунохроматографического процесса – 20 мин. Объем вносимой в иммунохроматографический тест пробы составлял 150 мкл для моноаналитных тестов и 500 мкл для МИУ.

Было проведено экспериментальное сравнение чувствительности моноаналитных иммунохроматографических тестов для выявления токсинов с МИУ. Показатели чувствительности были практически идентичными. Это экспериментальное наблюдение хорошо согласуется с теоретическими представлениями об иммунохроматографическом анализе [7].

Мультианалитные иммунохроматографические тесты имеют ряд преимуществ по сравнению с моноаналитными. МИУ позволяют оператору за один цикл анализа выявлять 5 токсинов,кратно увеличивая производительность анализа за счет уменьшения промежуточных манипуляций. Себестоимость расходных материалов при использовании МИУ ниже стоимости пяти моноаналитных тестов, т.к. уменьшается количество расходных материалов. Вышесказанное позволяет рассматривать МИУ как эффективный и удобный инструмент экспресс-индикации токсинов.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Германчук В.Г., Уткин Д.В., Щербакова С.А. Анализ современных методов и средств экспрессной индикации токсинов.

Пробл. особо опасных инф. 2012; 1(112):51–4.

2. Титов А.А., Шиленко И.В., Морозов А.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. Разработка и оптимизация иммунохроматографических тестов для выявления ботулинических токсинов. *Прикладная биохим. и микробиол.* 2012; 48(2):249–56.

3. Шиленко И.В., Титов А.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. Разработка мультианалитного иммунохроматографического теста для выявления ботулинических токсинов. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):68–70.

4. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2014; 55:81–93. DOI: 10.1016/j.trac.2013.11.007

5. Lattanzio V.M.T., Nivarlet N., Lippolis V., Della Gatta S., Huet A.C., Delahaut P., Granier, A., Visconti B. Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of Fusarium mycotoxins in cereals. *Anal. Chim. Acta.* 2012; 718:99–108.

6. Taranova N.A., Byzova N.A., Zaiko V.V., Starovoitova T.A., Vengerov Y.Y., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: application to the determination of drugs of abuse. *Microchim. Acta.* 2013; 180:1165–72.

7. Wong R.C., Tse H.Y., editors. Lateral flow immunoassay. New York: Humana Press; 2009. 223 p.

References

1. Germanchuk V.G., Utkin D.V., Shcherbakova S.A. [Analysis of the modern methods and means for rapid toxin indication]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 112(2):51–4.

2. Titov A.A., Shilenko I.V., Morozov A.A., Yarkov S.P., Zlobin V.N. [Development and optimization of immune-chromatographic tests for botulinic toxins detection]. *Prikladnaya Biokhim. Mikrobiol.* 2012; 48(2):249–56.

3. Shilenko I.V., Titov A.A., Yarkov S.P., Zlobin V.N. [Development of the multi-analyte test for immune-chromatographic detection of botulinic toxins]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 109(3):68–70.

4. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2014; 55:81–93. DOI: 10.1016/j.trac.2013.11.007

5. Lattanzio V.M.T., Nivarlet N., Lippolis V., Della Gatta S., Huet A.C., Delahaut P., Granier, A., Visconti B. Multiplex dipstick immunoassay for semi-quantitative determination of Fusarium mycotoxins in cereals. *Anal. Chim. Acta.* 2012; 718:99–108.

6. Taranova N.A., Byzova N.A., Zaiko V.V., Starovoitova T.A., Vengerov Y.Y., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: application to the determination of drugs of abuse. *Microchim. Acta.* 2013; 180:1165–72.

7. Wong R.C., Tse H.Y., editors. Lateral flow immunoassay. New York: Humana Press; 2009. 223 p.

Authors:

Shilenko I.V., Yarkov S.P., Shaulina E.K., Titov A.A., Brovkina A.N., Khranov E.N. State Research Institute of Biological Engineering. Building 1, 75, Moscow, Volokolamskoye Highway, 125424, Russian Federation. E-mail: niibp@dol.ru

Об авторах:

Шиленко И.В., Ярков С.П., Шаулина Е.К., Титов А.А., Бровкина А.Н., Храмов Е.Н. Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. Российская Федерация, 125424, Москва, Волоколамское шоссе, 75, к. 1. E-mail: niibp@dol.ru

Поступила 24.03.15..