

С.П.Ярков, И.В.Шиленко, С.Н.Скопинская, В.Н.Злобин

**КОМПЛЕКТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ТОКСИНОВ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ**

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

Разработан иммунохроматографический анализ с люминесцентной детекцией для выявления бактерий, вирусов, токсинов и аппаратура для его проведения. Предлагаемый подход превышает по чувствительности выявления микроорганизмов и токсинов традиционный иммунохроматографический анализ, основанный на реакции антител, маркированных коллоидным золотом в несколько раз. На основе разработки предложен комплект иммунохроматографического люминесцентного анализа (КИЛ-1), который может быть рассмотрен как техническое средство для экспресс-анализа образцов, взятых из объектов внешней среды, для индикации биологических поражающих агентов в случае возникновения чрезвычайных ситуаций, связанных с террористическими актами, на транспорте и местах массового скопления людей, при скрининге почтовой корреспонденции, либо для облегчения идентификации биопатогенов после этапа биологического обогащения отобранных проб.

*Ключевые слова:* иммунохроматография с люминесцентной детекцией, бактерии, вирусы, токсины.

Риск возникновения чрезвычайных ситуаций, включающий вспышки особо опасных инфекций, достаточно высок. Это обусловлено не только наличием естественных резервуаров патогенных микроорганизмов, трансграничным переносом инфекций, но и возможностью террористических актов с применением биологических средств, авариями в научно-исследовательских институтах и на предприятиях по производству вакцин и сывороток [3]. Система государственного санитарно-эпидемиологического надзора обязана своевременно выявить, идентифицировать и организовать ликвидацию вспышки инфекционного заболевания. Арсенал методов индикации возбудителей заболеваний, имеющийся в настоящее время в распоряжении эпидемиологов, достаточно широк – от традиционных бактериоскопических и бактериологических методов, постановки биопроб на животных, до метода флуоресцирующих антител (МФА), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Перечисленные выше методы индикации и идентификации микроорганизмов хорошо зарекомендовали себя на практике, но в то же время не лишены известных недостатков они занимают много времени – с учетом предварительного культурального обогащения пробы время индикации может достигать от 72 ч и более. Проведение индикации, как правило, проводится в лабораторных условиях. Для проведения иммунохроматографического анализа также необходим высококвалифицированный персонал [4].

Чувствительным, быстрым и специфичным методом идентификации микроорганизмов и токсинов, пригодным для применения в условиях небольших стационарных и мобильных лабораторий, а также в полевых условиях, является иммунохроматографический анализ.

Этим методом можно выявлять бактериальные вегетативные клетки, споры, вирусы, токсины, при анализе неизвестных порошков, смывов из окру-

жающей среды [6, 9, 10], а также идентифицировать культуры микроорганизмов, выращенных в бактериологической лаборатории, при анализе проб пищевых продуктов. Известны иммунохроматографические экспресс-тесты Singlepath и Duopath производства фирмы Merck (Германия) для выявления бактерий рода *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli* O157:H7 и веротоксинов энтерогеморрагических штаммов *E. coli* в пищевых продуктах и продовольственном сырье, водных объектах окружающей среды и биоматериале человека. Чувствительность определения составила для бактерий *Listeria monocytogenes* –  $10^4$ – $10^6$  м.к./мл, бактерий рода *Salmonella* –  $10^4$ – $10^7$  м.к./мл, *E. coli* O157:H7 –  $10^4$ – $10^7$  м.к./мл [2].

Выпускается отечественная укладка иммунохроматографических индикаторных элементов «УИХЭ-1» (разработчик и производитель ФГУП ГосНИИ биологического приборостроения Федерального медико-биологического агентства) для выявления возбудителей чумы, туляремии, сапа, сибирской язвы и ботулинического токсина типа А в смывах из объектов внешней среды. Чувствительность индикации составляет  $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$  м.к./мл и 250 нг/мл ботулинического токсина типа А. Длительность анализа без учета времени пробоподготовки – 25–30 мин. Перечисленные выше иммунохроматографические технические средства имеют колориметрический принцип регистрации и основаны на применении золь коллоидного золота, используемых в качестве маркера антител. Вывод о наличии или отсутствии в пробе искомого биологического агента делается визуально, по наблюдению оператором ярко окрашенной вишневой полосы в тестовом поле иммунохроматографического индикаторного элемента (ИИХЭ). Чувствительность колориметрических иммунохроматографических тестов близка к чувствительности РНГА и ТИФА, однако исключает такие стадии анализа, как сенсibilизация полистирольных планшетов, разведения пробы, промывки, термостатированные инкубации, внесе-

ние хромогенных субстратов и меченных ферментной меткой антител.

В то же время описаны методологические приемы [7, 11, 12], позволяющие многократно повысить чувствительность иммунохроматографического анализа за счет люминесцентного метода детекции, сохраняя такие достоинства иммунохроматографического анализа, как отсутствие многостадийности процедуры, применение минимума реагентов.

Целью данной работы было создание экспериментального образца носимого комплекта для проведения люминесцентного иммунохроматографического анализа, позволяющего выявлять антигены возбудителей особо опасных инфекций, бактериальные и растительные токсины в объектах окружающей среды при проведении работ в лабораторных и полевых условиях.

### Материалы и методы

Принцип конструирования индикаторных иммунохроматографических элементов с люминесцентной детекцией сходен с таковым для иммунохроматографических индикаторных элементов с колориметрической детекцией [5]. Изготовление иммунохроматографических индикаторных элементов осуществляли согласно разработанной ранее схеме технологического процесса [1], с заменой подложки, пропитанной конъюгатом антител с коллоидным золотом, на подложку с конъюгатом антител с люминесцирующими латексами. Полученный мультимембранный композит помещали в пластиковые оправы и запаивали с осушителем в водогазонепроницаемые пластиковые пакеты. В качестве основы для получения конъюгата с поликлональными или моноклональными антителами против антигенов микроорганизмов использовали карбоксилированные латексы («Magsphere», США) диаметром 330 нм, окрашенные в массу флуоресцентным красителем. Конъюгаты люминесцирующих латексов с иммуноглобулинами получали химической сшивкой [8]. В работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), калия карбонат, натрий фосфорнокислый однозамещенный безводный, калий фосфорнокислый 2-замещенный безводный и сахарозу («Sigma»), азид натрия («Merck»), твин-20 («Fluka»), антитела кроличьи антимышинные и антитела козы антикроличьи («Sigma»), мембраны для иммунохроматографии «Hi-Flow Plus HF120 или HF240» («Millipore»).

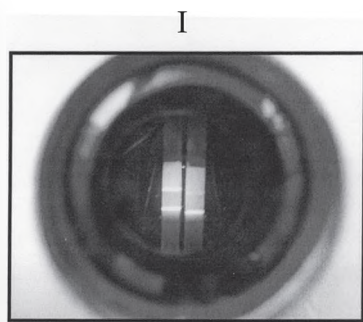
В качестве моделей возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний использовали вакцинные штаммы возбудителя туляремии (штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ), чумы (штамм *Yersinia pestis* EV), спор сибирской язвы (штамм *Bacillus anthracis* СТИ), осповакцину, ботулинический анатоксин типа А, штаммы получены из ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Использовали также рекомбинантный антиген VP40 вируса лихорадки Эбола (штамм Заир), полученный из ГНЦ прикладной вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Роспотребнадзора, стафилококковый энтеротоксин типа В, полученный из ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора и препарат рицина, выделенный из бобов *Ricinus communis* в ГосНИИ ОХТ Т.И.Новожиловой (Москва), препарат холерного экзотоксина и антисыворотка к нему были получены из РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов). В качестве моделей растворимых антигенов использовали внешние мембраны клеточных стенок, содержащих липополисахаридный антиген возбудителя туляремии штамм *F. tularensis* 543 (ЗАО «Институт инженерной иммунологии»), капсульный антиген Ф1 возбудителя чумы (РА «Эпидбиомед»). Моноклональные антитела и фракции иммуноглобулинов против указанных антигенов и клеток микроорганизмов получали в РА «Эпидбиомед» и ООО «Импакт», (Москва) ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора.

Для наблюдения результатов люминесцентного иммунохроматографического анализа нами сконструированы экспериментальные образцы приборов: регистратор люминесценции видеоцифрового «РЛВ-1» и устройство для визуализации люминесцентных иммунохроматограмм «УВ-1». В обоих приборах осуществляется освещение поля иммунохроматограммы светом светодиодов высокой яркости с максимумом длины волны 380 нм, более длинноволновая компонента излучения светодиода отсекается светофильтром УФС-5. Под действием ультрафиолетового излучения возбуждается люминесценция латексов в аналитической и контрольной зонах иммунохроматограмм. Свет эмиссии люминесценции проходит через стеклянный светофильтр ЖС-11 и поступает для последующей регистрации. В приборе УВ-1 люминесценция наблюдается визуально, при этом иммунохроматограммы анализируемой пробы и отрицательного контроля располагаются рядом, что облегчает сравнение оператором интенсивностей аналитических полос. В приборе РЛВ-1 применен видеоцифровой принцип получения изображения люминесцентной иммунохроматограммы с последующей обработкой сигнала специализированной программой LUM-VIS v 03, разработанной нами. Программа работает в среде операционной системы Windows XP на персональной ЭВМ типа «ноутбук». Электропитание прибора РЛВ-1 осуществляется от USB-порта компьютера, время непрерывной работы в автономном режиме не менее 2 ч. Общая масса прибора без компьютера составляет 545 г, габаритные размеры 120×80×96 мм. Интерфейс программы строит гистограммы люминесценции аналитической и контрольной зон, позволяет вычитать фоновые линии, сравнить интегральную интенсивность светимости этих зон и рассчитать отношение интегральной интенсивности люминесценции аналитической зоны к интегральной интенсивности люминесценции контрольной зоны ( $Q = I_a/I_c$ ), при этом коэффициент вариации величины  $Q$  не превышает 1,5 %.

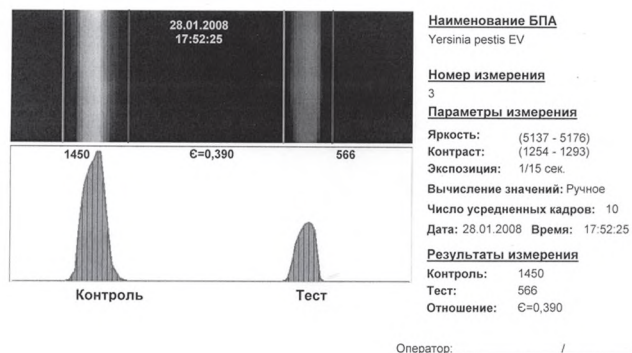
Для каждой партии люминесцентных иммунохроматографических элементов рассчитывали поро-





LUMINESCENCE VISUALIZATION v.0.3

II



Люминесцентный хроматографический анализ:

I – внешний вид люминесцентных иммунохроматограмм клеток *Y. pestis* в концентрации 100 тыс. м.к./мл (иммунохроматограмма отрицательного контроля – справа), наблюдаемых оператором визуально, с помощью прибора УВ-1; II – распечатка результатов люминесцентного иммунохроматографического анализа клеток *Y. pestis* в концентрации 50 тыс. м.к./мл, осуществляемая регистратором люминесценции видеоцифровым – РЛВ-1

вое значение  $Q_{\text{п}}$ , которое характеризовало чувствительность данной партии по формуле:

$$Q_{\text{п}} = Q_{\text{ср}} + 2 \left[ \frac{\sum (Q_i - Q_{\text{ср}})^2}{(n - 1)} \right]^{0.5}$$

где:  $Q_{\text{ср}} = \sum Q_i / n$  – среднее значение для иммунохроматограмм отрицательных контролей;  $Q_i$  –  $i$ -тое значение измеренного отрицательного контроля;  $n$  = 20–25 – количество измерений.

Если для образца, содержащего антигены микроорганизмов, измеренная величина

$Q > Q_{\text{п}}$ , то результат анализа считали положительным, в том же случае, если  $Q \leq Q_{\text{п}}$ , то результат считали отрицательным.

Необходимо отметить, что при хорошей адаптации глаза оператора к условиям низкой освещенности результаты визуального и приборного методов наблюдения сигналов люминесценции при проведении иммунохроматографии практически не различались. На рисунке изображены результаты наблюдений люминесцентного иммунохроматографического анализа клеток возбудителя чумы штамм *Yersinia pestis* EV на приборах УВ-1 и РЛВ-1.

### Результаты и обсуждение

Принцип достижения аналитического эффек-

та в иммунохроматографии на мембранах заключается в следующем. Жидкая проба, содержащая микроорганизмы, антигены или токсины наносится на пористую подложку, реагируя с антителами, конъюгированными с люминесцентными латексами. Образованный комплекс имеет люминесцентные свойства. Полученный иммунный комплекс под действием капиллярных сил током жидкости перемещается по нитроцеллюлозной мембране, достигает аналитической зоны, где происходит его иммобилизация на мембране за счет связывания с антителами аналитической зоны. В этой зоне образуется люминесцирующий «сэндвич» конъюгата люминесцирующих латексов, связанных с микробными клетками, и антител, иммобилизованных на мембране. Как правило, для аналитической зоны подбирают антитела к другим антигенным эпитопам инфекционного агента. Часть жидкой пробы продолжает перемещение по нитроцеллюлозной мембране, связываясь с антителами контрольной зоны. Наличие люминесценции в контрольной зоне косвенно указывает на иммунохимическую активность конъюгата. Это важно для валидации всего иммунохроматографического анализа, особенно после периода хранения ИИХЭ. Наличие на нитроцеллюлозной мембране двух люминесцирующих полос свидетельствует о присутствии в искомой пробе инфекционного агента. Наличие люминесценции лишь в контрольной зоне говорит об отсутствии искомого возбудителя и сохранности индикаторного реагента (конъюгата люминесцирующих латексов с антителами). Отсутствие люминесценции в обеих зонах указывает на непригодность ИИХЭ. Оптимум времени анализа достигался через 15–25 мин.

Нами созданы экспериментальные образцы люминесцентных ИИХЭ для выявления вегетативных и споровых форм микроорганизмов, растворимых антигенов, вирусов, токсинов. Сравнительная чувствительность люминесцентного и колориметрического иммунохроматографического анализа указанных объектов приведена в таблице. Для проведения корректного сравнения колориметрические ИИХЭ изготовлены из тех же партий антител и иммунохроматографических мембран, что и ИИХЭ с люминесцентной детекцией.

Люминесцентные ИИХЭ по чувствительности превосходили ИИХЭ с коллоидным золотом, особенно это хорошо видно на примере рицина, стафилококкового энтеротоксина типа В, растворимых антигенов микроорганизмов. Время анализа для обоих вариантов регистрации было примерно равным. ИИХЭ для возбудителей чумы, туляремии и сибирской язвы были специфичными по отношению к возбудителям особо опасных инфекционных заболеваний, а также по отношению к гетерологичным микроорганизмам (*Yersinia pseudotuberculosis* (I–IV серовара), *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Brucella abortus* 19BA, *Salmonella thyphi*, *Escherichia coli* HB101, *Vibrio cholerae* 569-B), взятым в концентрации  $10^8$  м.к./мл. ИИХЭ для выявления

**Сравнительная чувствительность ИИХЭ  
с люминесцентной и колориметрической детекцией**

Наименование микроорганизма или токсина	Чувствительность иммунохроматографического анализа		Отношение чувствитель- ностей люми- несцентного и колориме- трического анализа
	Люмине- сцентная детекция на приборе РЛВ-1	Колориметри- ческая визуальная детекция	
Возбудитель чумы, штамм <i>Y. pestis</i> EV, м.к./мл	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$	10
Ф1 антиген возбудителя чумы, нг/мл	0,5	5,0	10
Возбудитель сибирской язвы, штамм <i>B. anthracis</i> СТИ, м.к./мл	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	10
Возбудитель туляремии, штамм <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ, м.к./мл	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	1
Внешние мембраны клеточных стенок <i>F. tularensis</i> , содержащие ЛПС-антиген, нг/мл	0,5	15,0	30
Вирус осповакцины, ООВ/мл	$1 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	5
Антиген VP40 вируса возбудителя лихорадки Эбола, нг/мл	100,0	250,0	2,5
Ботулинический анатоксин типа А, эквивалентный MLD <sub>50</sub> /мл	150,0	300,0	2
Стафилококковый энтеротоксин типа В, нг/мл	10,0	30,0	3
Холерный экзотоксин, нг/мл	500,0	1000,0	2
Рицин, нг/мл	10,0	250,0	25

Примечание. MLD<sub>50</sub>/мл – доза токсина, приводящая к 50 % смертности популяции белых мышей, пораженных токсином.

ботулинического анатоксина типа А не давали перекрестных реакций с дифтерийным и столбнячным анатоксинами, а также ботулиническими анатоксинами типов В, С, D, E. Наличие 1 мг/мл пыли в исследуемых суспензиях микроорганизмов и токсинов не влияло на чувствительность анализа. ИИХЭ были работоспособны при плюсовых температурах от 10 до 35 °С, и сохраняли свои свойства при комнатной температуре в течение года.

На основе сконструированных ИИХЭ с люминесцентной детекцией и приборов РЛВ-1 и УВ-1 создан экспериментальный образец комплекта иммунохроматографического люминесцентного – КИЛ-1. Иммунохроматографические индикаторные элементы помещены в водонепроницаемый корпус, изготовленный из ударопрочного поливинилхлорида размерами 400×450×190 мм, устойчивого к дезинфекции 70 % раствором этилового спирта, дезинфекционно-го средства «Тримецид», 3 % перекиси водорода в сочетании с 1 % раствором ПАВ типа «Лотос». Масса комплекта не превышает 6,0 кг.

Помимо люминесцентных ИИХЭ, для анализа проб, содержащих патогены, в комплект входит прибор РЛВ-1, портативный компьютер, буферы ана-

лиза, приспособления для отбора проб (стерильные тампоны, пробирки, 0,9 % раствор натрия хлорида), люминесцентные ИИХЭ для выработки навыков работы, пакеты для сбора биологических отходов и их автоклавирования, перчатки, ножницы, пинцеты. Как вариант комплектации прибор РЛВ-1 может быть заменен на прибор визуального наблюдения УВ-1. Комплект КИЛ-1 может быть перевозиться в транспортнй таре любым видом транспорта.

Комплект иммунохроматографического люминесцентного анализа (КИЛ-1) может быть рассмотрен как техническое средство для экспресс-анализа образцов, взятых из объектов внешней среды, для выявления биологических поражающих агентов в случае возникновения чрезвычайных ситуаций, связанных с террористическими актами, на транспорте и местах массового скопления людей, при скрининге почтовой корреспонденции, либо для облегчения идентификации биопатогенов после этапа биологического обогащения отобранных проб.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бызова Н.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. и др. Физиология и патология иммунной системы. 2005; 9(8):41–5.
2. Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства Merck (Германия): методические рекомендации. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2004. 23 с.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. Пробл. особо опасных инф. 2007; 94(2):5–10.
4. Онищенко Г.Г., редактор. Организация ликвидации медико-санитарных последствий биологических, химических и радиационных террористических актов: практическое руководство. М.: ФГУ «ВЦМК «Защита»; 2005. 328 с.
5. Ярков С.П., Третьяков С.И., Башарова Л.А. и др. Вестник РАМН. 2007; 12:22–6.
6. Aidoo S., Ampofo W.K., Brandful J.A.M., et al. J. Clin. Microbiol. 2001; 39(7):2572–75.
7. Alivisatos P. Nature Biotechnology. 2004; 22(1):47–52.
8. Birnbaum S., Uden C., Magnusson C. G. M., et al. Anal. Biochem. 1992; 206:168–71.
9. Chanteau S., Rahalison I., Rarsitorahina M., et al. J. Med. Microbiol. 2000; 290(3):274–83.
10. King D., Luna V., Cannons A., Cattani J., et al. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:3454–55.
11. Linderfelt B.M., Matoussi H., Goldman E.R. Anal. Chem. 2003; 75:4043–49.
12. Niedbala R.S., Feindt H., Kardos K., et al. Anal. Biochem. 2001; 293(1):22–30.

S.P.Yarkov, I.V.Shilenko, S.N.Skopinskay, V.N.Zlobina

#### The Set for Detection of Etiological Agents of Particularly Dangerous Infectious Diseases and Toxins by Means of Luminescent Immunochromatographic Analysis

State Research Institute of Biological Instrument Construction, Moscow

Immunochromatographic analysis with luminescent detection for indication of bacteria, viruses and toxins and apparatus for its carrying out were developed. The suggested approach is several times more sensitive as regards microorganisms and toxins detection than the traditional immunochromatographic analysis which is based on the reaction of antibodies marked by colloidal gold. The set for immunochromatographic luminescent analysis (SIL-1) was offered on the basis of this elaboration. It can be considered as technical instrument for express analysis of environmental samples, for indication of biological affecting agents in case of emergency situations (terrorist attacks on transport and in populated area), for screening of mail, or facilitation of biopathogen identification after the stage of biological enrichment of selected samples.

**Key words:** immunochromatography with luminescent detection, bacteria, viruses, toxins.

Поступила 11.02.08.