

А.В.Никитина<sup>1</sup>, В.Г.Помелова<sup>1</sup>, Т.А.Быченкова<sup>1</sup>, Д.В.Парамонов<sup>1</sup>, Т.С.Кострюкова<sup>1</sup>, Н.С.Осин<sup>2</sup>

## ИММУНОЧИПЫ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПЯТИ БОТУЛОТОКСИНОВ МЕТОДОМ ФОСФОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА (ФОСФАН)

<sup>1</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения», Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>ЗАО «Иммуноскрин», Москва, Российская Федерация

**Цель работы.** Разработать и сравнить по чувствительности тесты для одновременного обнаружения ботулотоксинов А, В, С, Е, F методом мультиплексного фосфоресцентного анализа (ФОСФАН) с применением стандартной (на основе Pt копропорфирина) и модифицированной (на основе биоспецифичных наночастиц) систем регистрации фосфоресцентного сигнала. **Материалы и методы.** Иммуноанализ по технологии ФОСФАН выполняли в лунках стандартного 96-луночного микропланшета. На дне каждой лунки были напечатаны в виде микропятен моноспецифические антитела и поливалентный иммуноглобулин. Диапазон анализируемых концентраций анатоксинов – от 100 до 0,005 нг/мл. Для проявления реакции использовали смесь конъюгированных с биотином моноспецифических и поливалентного иммуноглобулинов и детекторные системы на основе конъюгатов стрептавидина с Pt копропорфирином или полистироловыми наночастицами, содержащими хелат европия. Люминесценцию обоих метчиков регистрировали на биочип-анализаторе в режиме временного разрешения. Порог детекции определяли как минимальную концентрацию анатоксина, при которой отношение P/N  $\geq 2$ , а число таких проб (в серии из 10–30 экспериментов) не менее 50 %. **Результаты и выводы.** Разработанные иммуночипы обеспечивали группоспецифическое обнаружение пяти ботулотоксинов с возможностью типоспецифической идентификации ботулотоксинов А, В и Е. Перекрестные реакции между ботулотоксинами не выявлены. Применение фосфоресцентных наночастиц позволило повысить чувствительность детекции примерно на порядок до 10 пг/мл. Разработанные мультиплексные тесты можно рекомендовать для специфической индикации ботулотоксинов в клинических образцах, пробах из объектов окружающей среды или пищевых продуктов.

**Ключевые слова:** ботулотоксины типов А, В, С, Е, F, иммуночипы, мультиплексный фосфоресцентный анализ (ФОСФАН), биоспецифичные наночастицы, Pt копропорфирин, хелат Eu.

Корреспондирующий автор: Анна Викторовна Никитина, e-mail: an-na-nikitina@ya.ru.

A.V.Nikitina<sup>1</sup>, V.G.Pomelova<sup>1</sup>, T.A.Bychenkova<sup>1</sup>, D.V.Paramonov<sup>1</sup>, T.S.Kostruykova<sup>1</sup>, N.S.Osin<sup>2</sup>

## Microarray Immunoassay Tests for Simultaneous Detection of Five Botulinum Toxins by Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN)

<sup>1</sup>State Research Institute of Biological Instrument Engineering, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>CJSC “Immunoscreen”, Moscow, Russian Federation

Combination of multiplex microarray immunoassay tests and luminescent nanoparticle tags is considered as a promising approach to the development of highly sensitive, specific, and rapid methods of causative agent detection. **Objective** of this study was to develop and compare the sensitivity of the tests for simultaneous detection of five botulinic toxins (A,B,C,E,F) applying multiplex phosphorescence analysis (PHOSPHAN) using standard (Pt coproporphyrin tag-based) and modified (europium containing nanoparticles) systems of phosphorescent signal registration. **Materials and methods.** PHOSPHAN assay was performed in standard 96 well microplate. The toxoids added to the wells interacted with monospecific and polyvalent immunoglobulins printed as tiny spots on the bottom of each well, and with a mixture of the same antibodies conjugated to biotin. Analyzed anatoxin concentration range – 0.005 to 100 ng/ml. The reaction was manifested by streptavidin conjugated to either Pt coproporphyrin, or the luminescent nanoparticles. The luminescence of both tags was recorded in time-resolved mode by Biochip Analyzer. The limit of detection corresponded to a minimum toxoid concentration, at which the P/N ratio was equal or exceeded 2, while the number of such samples (in a series of 10-30 experiments) was no less than 50%. **Results and conclusions.** Both multiplex tests provided for simultaneous group-specific detection of five botulinum toxins with the option of type-specific (A, B, E) identification. No cross-reactivity was revealed. The use of phosphorescent nanoparticles allowed for the increase in detection sensitivity by an order of magnitude, up to 10 pg/ml. The tests developed could be recommended for specific detection and identification of botulinum toxins in clinical, environmental, and food samples.

**Key words:** botulinum toxin types A,B,C,E,F, microarray immunoassay tests, multiplex phosphorescence analysis (PHOSPHAN), biospecific nanoparticles, Pt coproporphyrin, Eu chelate.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Anna V. Nikitina, e-mail: an-na-nikitina@ya.ru.

**Citation:** Nikitina A.V., Pomelova V.G., Bychenkova T.A., Paramonov D.V., Kostruykova T.S., Osin N.S. Microarray Immunoassay Tests for Simultaneous Detection of Five Botulinum Toxins by Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:64–68. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-64-68

Ботулинические нейротоксины относятся к числу наиболее опасных для человека бактериальных токсинов. Они продуцируются в анаэробных условиях грамположительной бактерией *Clostridium*

*botulinum* и являются причиной ботулизма – крайне тяжелого заболевания, характеризующегося поражением нервной системы. Известны семь иммунологически различающихся серотипов ботулотоксинов (БТ), обозначаемых латинскими буквами А-Г, среди которых БТА, БТВ и БТЕ чаще всего ответственны за развитие ботулизма у человека [12]. Ботулотоксины попадают в организм в основном при употреблении зараженных пищевых продуктов, не прошедших должной термической обработки, при загрязнении почвой открытой раны, а также при вдыхании аэрозоля, содержащего токсин. Помимо естественных путей заражения, возможно преднамеренное применение ботулотоксинов в террористических целях.

Ботулотоксины всех серотипов обладают сходной биологической активностью, вызывая нарушение транспорта синаптического пузырька с ацетилхолином и его высвобождение в синаптическую щель, что, в свою очередь, приводит к параличу мышц [11]. Поскольку эффективность лечения ботулизма зависит от количества токсина, попавшего в организм, и своевременности оказания медицинской помощи, то весьма актуальна разработка экспрессных, высокочувствительных и специфичных методов обнаружения.

В качестве «золотого стандарта» для лабораторного выявления ботулотоксинов рассматривается метод биопробы на белых мышах, обеспечивающий порог детекции (по БТА и БТВ) порядка 10–30 пг/мл [6, 13]. Его постановка, однако, может занимать до 72 ч. Другие методы (иммунохроматографический или иммуноферментный анализ, реакция пассивной гемагглютинации, молекулярные методы) более быстрые, но значительно менее чувствительные [4]. Достижение высоких показателей чувствительности и специфичности, а также сокращение времени и стоимости анализа возможно при использовании мультиплексных методов для одновременного обнаружения нескольких токсинов [8] и систем детекции на основе люминесцентных наночастиц [7].

В данной работе для создания мультиплексного теста применена отечественная биочип-технология фосфоресцентного анализа (ФОСФАН™) [1], эффективность которой для специфической индикации и диагностики ряда особо опасных инфекций была продемонстрирована ранее [2, 9]. Суть технологии состоит в выявлении аналитов с помощью длительно люминесцирующих (фосфоресцирующих) соединений в режиме временного разрешения люминесценции, которая регистрируется с поверхности микрозон (микроэрреев), напечатанных на дне лунок стандартных полистироловых микропланшетов. В качестве универсальной детектирующей системы используют стрептавидин, маркированный фосфоресцентной меткой – платинакопропорфирином (Pt КП). Перспективным новым метчиком для ФОСФАН могли бы оказаться полимерные наночастицы, содержащие хелатный комплекс ионов европия с нафтоилтрифторацетоном [7]. Разработка отечествен-

ной технологии синтеза таких частиц к настоящему времени завершена в ФГУП «ГосНИИБП».

Цель исследований – разработать и сравнить по чувствительности тесты для одновременного обнаружения ботулотоксинов А, В, С, Е, F методом ФОСФАН с применением стандартной (на основе Pt КП) и модифицированной (на основе биоспецифичных наночастиц) систем регистрации фосфоресцентного сигнала.

## Материалы и методы

В работе использованы моноклональные антитела (МКА) к БТА, клоны БТА 232 и 111 (ООО «Импакт», Москва), поликлональные моноспецифические антитела к БТВ или БТЕ и поливалентный иммуноглобулин к ботулотоксинам А, В, С, Е, F (НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, Москва). МКА БТА 232 и БТА 111 представляли собой иммуноглобулины (фракция IgG1), выделенные методом аффинной очистки на протеин G-сефарозе (степень очистки более 95 %) из иммунной асцитной жидкости мышей BALB/c, инокулированных гибридами одноименных клонов. Иммуноглобулины антитоксические противоботулинические моноспецифические (фракция IgG) типов В и С были получены из кроличьих антисывороток к гомогенным нейротоксинам типов В, штамм В<sub>364</sub> или С, штамм С<sub>20</sub> соответственно. Каждый из этих иммуноглобулинов проявляет специфическую нейтрализующую активность в отношении только гомологичного ботулотоксина (БТВ или БТС). Иммуноглобулин (IgG) антитоксический противоботулинический поливалентный типов А, В, С, Е, F получен из антисыворотки кролика, иммунизированного смесью очищенных анатоксинов типов А, В и гомогенных анатоксинов типов С, Е, F. Обладает нейтрализующей активностью в отношении пяти указанных типов ботулотоксинов.

На первом этапе иммуноанализа перечисленные выше иммуноглобулины (кроме клона БТА 111) использовались в качестве первичных (улавливающих) антител. Они были напечатаны в виде микрозон (диаметром 0,5 мм) на дне лунки стандартного 96-луночного полистиролового микропланшета (Nunc, Дания), по 4 микрозоны на каждый иммуноглобулин (всего 16 микрозон). Печать проведена с помощью наноплоттера для контактной печати (ЗАО «ИММУНОСКРИН», Москва). Концентрация антител для печати – 100 мкг/мл. Буфер для сорбции – 0,1 М КББ, рН 9,6, содержащий 5 % глицерина (Sigma, США). После инкубации в течение 1 сут при 2–8 °С и последующей трехкратной отмывки и блокировки (1 ч при 37 °С) сенсibilизированный микропланшет высушивали, помещали в пластиковый пакет и хранили до исследования в холодильнике.

Иммуноанализ по технологии ФОСФАН выполняли в лунках микропланшета. В каждую лунку вносили по 10 мкл конъюгированных с биотином ан-

Результаты выявления пяти ботулотоксинов методом ФОСФАН с применением стандартной (Pt КП) и модифицированной (НЧ-Eu) систем регистрации фосфоресцентного сигнала

Выявляемый ботулотоксин	Значение P/N <sup>1)</sup> в микрозонах для обнаружения ботулотоксинов типа:				Порог детекции, нг/мл, в микрозоне с иммуноглобулином:	
	A	B	E	A, B, C, E, F <sup>2)</sup>	гомологичным	поливалентным
Система детекции на основе платина копропорфирина (Pt КП)						
A	41,4±12 <sup>3)</sup>	0,9±0,3	1,5±0,3	33,5±4,0	1	5
B	1,7±0,4	77,9±12,2	1,2±0,7	48,7±15,1	0,25	1
E	1,5±0,3	1,5±0,4	39,8±7,8	19,9±4,7	1	5
C	1,6±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	6,7±0,4	- <sup>4)</sup>	10
F	1,3±0,1	1,4±0,1	2,2±0,5	7,9±0,6	-	5
Система детекции на основе фосфоресцентных наночастиц (НЧ-Eu)						
A	42,1±4,1	1,1±0,1	0,9±0,1	38,5±4,8	0,25	0,25
B	1,7±0,1	107±15,2	1,0±0,1	52,2±8,8	0,010	0,25
E	1,1±0,1	1,4±0,1	52,8±18,6	22,9±4,1	0,25	0,25
C	1,1±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	10,1±0,5	-	0,5
F	1,2±0,1	1,0±0,1	1,9±0,2	12,8±0,7	-	0,5

Примечания: <sup>1)</sup> Для концентрации ботулотоксинов 100 нг/мл; <sup>2)</sup> Микрозона с поливалентным иммуноглобулином; <sup>3)</sup> Среднее значение P/N ± среднеквадратичное отклонение (из 8–10 повторных измерений); <sup>4)</sup> Не определяется в связи с отсутствием гомологичной микрозоны.

тител, представленных смесью МКА БТА 111, моноспецифических антител к БТВ и БТЕ, и поливалентного иммуноглобулина. Затем добавляли по 200 мкл одного из пяти БТ (анатоксинов) типов А, В, С, Е или F (НПО «Микроген», Уфа). Планшет инкубировали при комнатной температуре и встряхивании на шейкере в течение 90 мин. На этой стадии анализа выявляемый анатоксин образовывал иммунный комплекс с гомологичным и/или поливалентным иммуноглобулинами, сорбированными в соответствующих микрозонах на дне лунки планшета, и одновременно с гомологичным и/или поливалентным иммуноглобулинами, конъюгированными с биотином. Диапазон анализируемых концентраций анатоксинов от 100 до 0,005 нг/мл (разведения приготовлены на буфере – 0,1 М ТРИС, pH 7,7). После завершения стадии инкубации планшет трехкратно промывали буферным раствором.

Для выявления образовавшихся иммунных комплексов использовали две детекторные системы на основе стрептавидина, конъюгированного с Pt КП (стандартная система регистрации сигнала) или с полистироловыми наночастицами, содержащими инкорпорированный хелат ионов европия – НЧ-Eu (модифицированная система). Синтез биоспецифичных наночастиц проведен по технологии, разработанной специалистами ФГУП «ГосНИИБП». Конъюгаты стрептавидина с платина-копропорфирином (или с наночастицами) вносили по 30 мкл в каждую лунку. Микропланшет инкубировали при комнатной температуре и встряхивании на шейкере в течение 15 мин (при использовании Pt КП) или 120 мин (для НЧ-Eu), а затем трехкратно промывали буферным раствором и дополнительно 3 раза дистиллированной водой. После этого планшет высушивали на воздухе.

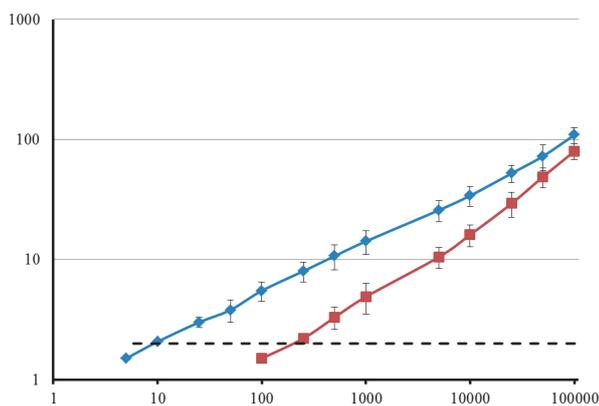
Люминесценцию обоих метчиков возбуждали на длине волны 365 нм и регистрировали на биочип-

анализаторе ИФИ-04 (ФГУП «ГосНИИБП») в режиме временного разрешения на длине волны 653 нм (для Pt КП) или 615 нм (для НЧ-Eu). Порог детекции определяли как минимальную концентрацию анатоксина, при которой интенсивность люминесценции пробы (Р) не менее чем в два раза превышала сигнал отрицательного контроля (N), а число проб со значением P/N ≥ 2 (в серии из 10–30 экспериментов) составляло не менее 50 %.

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты детекции пяти ботулотоксинов методом ФОСФАН в разработанных мультиплексных тестах. Положительное «срабатывание» (P/N ≥ 2) при выявлении БТА, БТВ или БТЕ регистрировали в микрозонах с гомологичным и поливалентным иммуноглобулинами, БТС и БТФ – только с поливалентным иммуноглобулином. Таким образом, положительный сигнал в зоне с поливалентным иммуноглобулином свидетельствовал о возможном наличии в исследуемой пробе любого из пяти БТ (или их смеси), из числа которых три токсина (БТА, БТВ и БТЕ) могли быть типированы на основе взаимодействия с соответствующей гомологичной микрозоной.

Перекрестные реакции между исследованными ботулотоксинами отсутствовали. Лишь при высокой концентрации (100 нг/мл) отмечено незначительное неспецифическое связывание БТФ с микрозоной для выявления БТЕ. Различия в чувствительности при взаимодействии с гомологичным и поливалентным иммуноглобулинами (для БТА, БТВ и БТЕ) наблюдали только в стандартной системе детекции. С фосфоресцентными наночастицами этот эффект был выявлен лишь для БТВ, чувствительность обнаружения которого с гомологичным иммуноглобулином была



Кривые титрования ботулотоксина типа В (БТВ) методом ФОСФАН с системой регистрации сигнала на основе фосфоресцентных наночастиц (ромбы) или платина копропорфирина (квадраты):

Пунктирная линия соответствует пороговому уровню детекции (P/N = 2). Разведения приготовлены на буферном растворе. По оси абсцисс: концентрация БТВ, пг/мл, по оси ординат: отношение сигнал/фон (P/N), отн.ед.

наиболее высокой (табл. 1).

Порог детекции ботулотоксинов в модифицированной системе с использованием фосфоресцентных наночастиц был существенно (до 25 раз) ниже, чем в стандартной системе на основе Pt КП (табл. 1). Это обусловлено высокой излучательной способностью наночастиц, содержащих до 2000 молекул фосфоресцентной метки. Достигнутый уровень чувствительности (по БТВ) – 10 пг/мл соответствовал  $8 \cdot 10^6$  молекул токсина в анализируемой пробе объемом 200 мкл (или  $1,4 \cdot 10^{-13}$  М) и был сопоставим с чувствительностью биопробы.

Система детекции на основе Pt КП обеспечивала определение ботулотоксинов в 400-кратном диапазоне концентраций: от 0,25 до 100 нг/мл. Применение фосфоресцентных наночастиц позволило расширить этот диапазон в 25 раз: от 10 пг/мл до 100 нг/мл (рисунок, табл. 2). Верхний предел детекции мог быть существенно выше 100 нг/мл, но из соображений экономии биоматериала такие исследования не про-

водились.

При исследовании проб, загрязненных почвой или с высокой концентрацией соли, используемой в качестве консерванта, наблюдалось существенное снижение чувствительности ФОСФАН. Аналогичное негативное влияние отмечено при детекции БТ в молочных продуктах (табл. 2), что может быть обусловлено блокирующим действием присутствующих в молоке авидинов на процесс связывания биотинилированных антител со стрептавидином [5], покрывающим поверхность наночастиц. Несмотря на это, достигнутый с фосфоресцентными наночастицами уровень чувствительности был достаточен для надежного выявления БТ в концентрациях ниже летальной дозы, установленной для взрослого человека при оральной интоксикации [3, 10].

Продолжительность анализа на иммуночипе с использованием фосфоресцентных наночастиц составляла примерно 3,5 ч, что существенно превышало показатель для стандартной схемы регистрации сигнала (табл. 2). В дополнительных экспериментах, выполненных на «чистых» пробах, была исследована возможность уменьшения времени анализа за счет сокращения длительности стадии инкубации с анатоксином (с 90 мин до 60, 30 или 15 мин) и/или стадии связывания с наночастицами (со 120 мин до 90, 60 или 30 мин). Было установлено, что общая длительность иммуноанализа могла быть уменьшена (без потери чувствительности) до 90 мин за счет сокращения времени инкубации с анатоксином (до 30 мин) и с наночастицами (до 60 мин). Дальнейшее сокращение длительности указанных стадий приводило к снижению отношения P/N, а следовательно, и к потере чувствительности. Вопрос о возможности сокращения времени иммуноанализа требует, однако, дополнительного изучения на пробах, представляющих собой сыворотки крови и/или «грязные» пробы, содержащие разного рода примеси.

Таким образом, разработанные иммуночипы обеспечивают одновременное группоспецифическое об-

Таблица 2

Аналитические характеристики иммуночипов для детекции ботулотоксинов методом ФОСФАН

Показатели	Система регистрации сигнала на основе	
	Pt КП	НЧ-Eu
Выявляемые токсины	БТА, БТВ, БТЕ, БТС, БТГ	
Время анализа (без пробоподготовки)	1 ч 45 мин	3,5 ч <sup>1)</sup>
Динамический диапазон, нг/мл	от 0,25–1 до 100	от 0,01–0,25 до 100
Уровень фоновой люминесценции, имп.	20–40	150–350
Порог детекции (на модели БТВ):		
в буферном растворе	0,25 нг/мл	10 пг/мл
в пробах, содержащих примеси почвы	10 нг/мл	50 пг/мл
в пробах, содержащих соль	10 нг/мл	100 пг/мл
в сыворотке крови человека	5 нг/мл	100 пг/мл
в пищевых продуктах (кроме молока)	Не исследовали	10–250 пг/мл
в молоке и молочных продуктах	Не исследовали	500 пг/мл

Примечание. <sup>1)</sup> Может быть сокращено до 90 мин без потери чувствительности.

нарушение пяти ботулотоксинов методом ФОСФАН с возможностью типоспецифической идентификации ботулотоксинов типов А, В и Е. Применение модифицированной системы регистрации сигнала на основе фосфоресцентных наночастиц позволяет повысить чувствительность детекции примерно на порядок по сравнению со стандартным подходом с использованием фосфоресцентного метчика Рт копропорфирина. Благодаря высокой чувствительности и специфичности, разработанные мультиплексные тесты можно рекомендовать для проведения специфической индикации ботулотоксинов в клинических образцах (сыворотка крови), пробах из объектов окружающей среды или пищевых продуктов.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Осин Н.С., Помелова В.Г., Соколов А.С., Быченкова Т.А., Бекман Н.И., Шарафудинова Т.Ю., Аслиян С.К., Ивановская Н.П., Ларичева С.Ю., Канаева Т.А. Фосфоресцентный микроанализ как новая технологическая платформа для молекулярной диагностики. *Вестник РАМН*. 2007; 12:3–10.
- Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Осин Н.С. Иммуночип на основе микропланшетной технологии ФОСФАН для определения иммуноглобулинов G к вирусам Западного Нила, Крымской-Конго геморрагической лихорадки и клещевой энцефалита. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 3(101):54–8.
- Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D. Hauer J., Layton M., Lillibridge S., Osterholm M.T., O'Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Swerdlow D.L., Tonat K.; Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 2001; 285(8):059–70.
- Capek P., Dickerson T.J. Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin Detection. *Toxins*. 2010; 2:24–53; DOI: 10.3390/toxins2010024.
- Doellgast G. J., Triscott M. X., Beard G. A., Bottoms J. D., Cheng T., Roh B. H., Roman M. G., Hall P. A., Brown E. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:2402–9.
- Ferreira J. L., Eliasberg S. J., Edmonds P., Harrison M. A. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinum toxin in food. *J. Food Prot.* 2004; 67(1):203–6.
- Jaras K., Tajudin A.A., Ressine A., Soukka T., Marko-Varga G., Bjartell A., Malm J., Laurell T., Lilja H. Europium nanoparticles for signal enhancement of antibody microarrays on nanoporous silicon. *J. Proteome Res.* 2008; 7:1308–14; DOI: 10.1021/pr700591j.
- Jenke K.L., Zhang Y., Kostenko Y., Fan Y., Garcia-Rodriguez C., Lou J., Marks J.D., Varnum S.M. Development of an ELISA microarray assay for the sensitive and simultaneous detection of ten biodefense toxins. *Analyst*. 2014; 139:5093–102; DOI: 10.1039/c4an01270d.
- Osin N.S., Pomelova V.G. Microarray immunophosphorescence technology for the detection of infectious pathogens. In: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. *Frontiers in Research*. Humana Press; 2008. P. 233–40. DOI: 10.1007/978-1-59745-569-5\_25.
- Scarlato A., Welt B. A., Cooper B.Y., Archer D., DeMarse T., Chau K.V. Methods for detecting botulinum toxin with applicability to screening foods against biological terrorist attacks. *J. of Food Science*. 2005; 70(8):121–30; DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11525.x.
- Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 2000; 80:717–66.
- Sharma S.K., Ferreira J.L., Eblen B.S., Whiting R.C.

Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1231–8. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1231-1238.2006.

13. Wictome M. W., Newton K., Jameson K., Hallis B., Dunnigan P., Mackay E., Clarke S., Taylor R., Gaze J., Foster K., Shone C. C. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(9):3787–92.

#### References

- Osin N.S., Pomelova V.G., Sokolov A.S., Bychenkova T.A., Bekman N.I., Sharaфudinova T.Yu., Asliyan S.K., Ivanovskaya N.P., Laricheva S.Yu., Kanaeva T.A. [Phosphorescent microarray as a basis for novel technological platform for molecular diagnostics]. *RAMS Bulletin*. 2007; 12:3–10.
- Pomelova V.G., Bychenkova T.A., Ossin N.S. [PHOSPHAN microplate technology-based microarray for detection of IgG antibodies against West Nile, Crimean-Congo hemorrhagic fever and tick-borne encephalitis viruses]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 3(101):54–8.
- Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D. Hauer J., Layton M., Lillibridge S., Osterholm M.T., O'Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Swerdlow D.L., Tonat K.; Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 2001; 285(8):059–70.
- Capek P., Dickerson T.J. Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin Detection. *Toxins*. 2010; 2:24–53; DOI: 10.3390/toxins2010024.
- Doellgast G. J., Triscott M. X., Beard G. A., Bottoms J. D., Cheng T., Roh B. H., Roman M. G., Hall P. A., Brown E. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:2402–9.
- Ferreira J. L., Eliasberg S. J., Edmonds P., Harrison M. A. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinum toxin in food. *J. Food Prot.* 2004; 67(1):203–6.
- Jaras K., Tajudin A.A., Ressine A., Soukka T., Marko-Varga G., Bjartell A., Malm J., Laurell T., Lilja H. Europium nanoparticles for signal enhancement of antibody microarrays on nanoporous silicon. *J. Proteome Res.* 2008; 7:1308–14; DOI: 10.1021/pr700591j.
- Jenke K.L., Zhang Y., Kostenko Y., Fan Y., Garcia-Rodriguez C., Lou J., Marks J.D., Varnum S.M. Development of an ELISA microarray assay for the sensitive and simultaneous detection of ten biodefense toxins. *Analyst*. 2014; 139:5093–102; DOI: 10.1039/c4an01270d.
- Osin N.S., Pomelova V.G. Microarray immunophosphorescence technology for the detection of infectious pathogens. In: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. *Frontiers in Research*. Humana Press; 2008. P. 233–40. DOI: 10.1007/978-1-59745-569-5\_25.
- Scarlato A., Welt B. A., Cooper B.Y., Archer D., DeMarse T., Chau K.V. Methods for detecting botulinum toxin with applicability to screening foods against biological terrorist attacks. *J. of Food Science*. 2005; 70(8):121–30; DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11525.x.
- Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 2000; 80:717–66.
- Sharma S.K., Ferreira J.L., Eblen B.S., Whiting R.C. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1231–8. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1231-1238.2006.
- Wictome M. W., Newton K., Jameson K., Hallis B., Dunnigan P., Mackay E., Clarke S., Taylor R., Gaze J., Foster K., Shone C. C. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(9):3787–92.

#### Authors:

Nikitina A.V., Pomelova V.G., Bychenkova T.A., Paramonov D.V., Kostryukova T.S. State Research Institute of Biological Instrument Engineering. 75/1, Volokolamskoe Highway, Moscow, 125424, Russian Federation. E-mail: an-na-nikitina@ya.ru.

Osin N.S. CJSC "Immunoscreen". 75/1, Volokolamskoe Highway, Moscow, 125424, Russian Federation.

#### Об авторах:

Никитина А.В., Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Парамонов Д.В., Кострюкова Т.С. Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. Российская Федерация, 125424, Москва, Волоколамское шоссе, 75/1. E-mail: an-na-nikitina@ya.ru.

Осин Н.С. ЗАО «Иммюноскрин». Российская Федерация, 125424, Москва, Волоколамское шоссе, 75/1.

Поступила 04.10.16.