

И.В.Шиленко, А.А.Титов, С.П.Ярков, В.Н.Злобин

**РАЗРАБОТКА МУЛЬТИАНАЛИТНОГО ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БОТУЛИНИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ***Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения, Москва*

Разработан мультианалитный тест на основе наночастиц коллоидного золота для одновременного выявления нейротоксинов (БТ) типов А и В, выделяемых *Clostridium botulinum*. Тест отличается наличием трех линий (двух тестовых и одной контрольной) в поле для регистрации результатов анализа. Тесты предполагается применять при анализе проб продуктов питания и проб, взятых из объектов окружающей среды. Чувствительность одновременного выявления БТ типов А (30 нг/мл) и В (10 нг/мл) не хуже, чем у моноаналитных тестов, сконструированных для выявления одного типа БТ. Показано, что тесты специфичны и могут быть применены для идентификации БТ в продуктах питания.

Ключевые слова: иммунохроматография, ботулинический токсин.

I.V.Shilenko, A.A.Titov, S.P.Yarkov, V.N.Zlobin

Development of the Multi-Analyte Test for Immune-Chromatographic Detection of Botulinum Toxins*State Research Institute of Biological Device Engineering, Moscow*

Designed is the multi-analyte test for simultaneous immune chromatographic detection of A & B type botulinum neurotoxins (BT), using colloid gold nanoparticles. It is meant for food and environmental samples' analysis. The sensitivity of simultaneous BT detection of the A (30 ng/ml) and B (10 ng/ml) types is as high as that of mono-analytical tests, designed for one type BT detection. The test is demonstrated to be a specific one and can be used for BT detection in food stuffs.

Key words: immune-chromatography, botulinum toxin.

Ботулинические токсины (БТ) крайне токсичны для человека [1, 10]. Из всего спектра БТ наиболее токсичен токсин типа А (БТА) который рассматривается как один из наиболее вероятных поражающих биологических агентов, пригодных для осуществления террористических актов [3]. Признанными методами выявления и идентификации БТ являются: биологический (реакция нейтрализации токсина типоспецифическими антисыворотками на белых мышах) [2], молекулярно-генетические [4], иммунохимические – реакция непрямой гемагглютинации [1], твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) [5], иммунохроматографический анализ (ИХА) [11].

Целью работы было конструирование мультианалитного иммунохроматографического теста (ИХ-тест) для одновременного выявления БТ типов А и В в одном цикле анализа в объектах окружающей среды и изучение его пригодности для выявления БТ в продуктах питания.

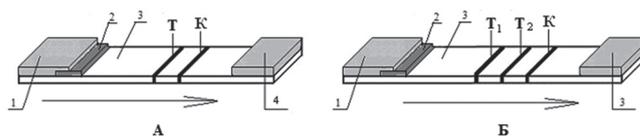
Материалы и методы

ИХ-тест представляет собой нарезанный на полоски мультимембранный композит, помещенный в пластиковую оправу. Для формирования мультимембранного композита применяли материалы фирмы «Millipore» – нитроцеллюлозные мембраны HF120, стекловолоконные и абсорбционные подложки. Антитела наносили на нитроцеллюлозную мембрану в виде линий. Моноаналитный тест содержал одну тестовую (Т) и одну контрольную (К) зоны, а мульти-

аналитный – две тестовых и одну контрольную зону антител (рисунок). Первая линия – тестовая зона (T_1) содержала моноклональные антитела (МКА) клон ВТА232 против БТА, вторая линия – тестовая зона (T_2) с МКА клон КВВ18 против БТ типа В (БТВ), третья линия – контрольная зона (К) состояла из кроличьих антимышиных иммуноглобулинов.

Сферические наночастицы коллоидного золота (НКЗ) средним диаметром (25 ± 5) нм получали по методу Френса [6]. Конъюгаты НКЗ с МКА клон ВТА 151 и/или ВТВ224 получали, как описано в [7, 8]. Суспензии конъюгатов оптической плотностью 3,0, измеренной при 524 нм, наносили на стекловолоконную подложку и подвергали высушиванию.

ИХА проводили при комнатной температуре. Результаты ИХА фиксировали визуально и/или с помощью анализатора иммунохроматограмм видеодифференциального «Рефлеком» (Россия) спустя 20 мин после внесения в ИХ-тест 150 мкл образца в 0,1 М



Схематическое изображение структуры моно- (А) и мультианалитного (Б) иммунохроматографических тестов для выявления ботулинических токсинов:

1 – подложка для нанесения образца; 2 – подложка с конъюгатом; 3 – аналитическая мембрана; 4 – впитывающая подложка; Т – тестовая зона с антителами к БТА или БТВ; Т₁ – тестовая зона с антителами к БТА; Т₂ – тестовая зона с антителами к БТВ; К – контрольная зона с антивидовыми антителами по отношению к антителам конъюгата. Стрелкой показано направление тока жидкости

фосфатном буфере (рН 7,8), содержащем 0,25 % БСА и 0,4 % TWEEN 20 – буфере анализа (БА). За положительный результат ИХА принимали появление в тестовых зонах Т₁ и/или Т₂ окрашенных линий, за отрицательный – их отсутствие. За ложноположительный результат принимали появление окрашенной линии в тестовой зоне в отсутствие токсинов в образце. При отсутствии окрашенной линии в контрольной зоне результаты считали недействительными.

В качестве рабочих моделей БТ типов А и В использовали паспортизованные очищенные препараты соответствующих анатоксинов, полученные из филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «Микроген», Уфа. Концентрация анатоксинов принималась равной концентрации белка в препарате.

Для исследования возможности выявления БТ в продуктах питания ИХА поступали следующим образом. Полутвердые продукты питания (консервы и сосиски) измельчали блендером, твердые продукты питания (вяленое мясо и рыба) измельчали ножом, затем блендером. В продукты питания вносили известные концентрации анатоксинов, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Соки центрифугировали при 7000 g в течение 30 мин, супернатант смешивали с БА 1:1 по объему. Вязкие образцы и образцы с высоким содержанием сахара или жира (мёд, сгущенное и цельное молоко) разбавляли БА 1:5 по весу и центрифугировали. Полутвердые и твердые продукты питания смешивали с БА 1:4 по весу и обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом диспергаторе (Labsonic 2000 «В. Braun», Германия) при охлаждении во льду в режиме «LOW» при максимальном резонансе в течение 60 с, затем центрифугировали, супернатант смешивали с БА 1:1 по объему. Доводили рН образцов до 7,5–8,0 путем внесения в образец 1N раствора NaOH.

Результаты и обсуждение

В нашей работе реализован вариант «сэндвич» ИХА, основанный на появлении окрашенной линии в тестовой зоне за счет образования комплекса конъюгат-аналит-антитело при взаимодействии МКА, специфичных к различным участкам белковых молекул токсинов. В контрольной зоне окрашенная линия появлялась при взаимодействии конъюгата с антителами контрольной зоны. Линии хорошо заметны визуально и могут регистрироваться с помощью приборов-рефлектометров.

Моноаналитные ИХ-тесты (рисунок, А) для выявления БТА или БТВ имели чувствительность выявления по анатоксинам 30 и 10 нг/мл соответственно.

Ключевой задачей исследования было получение мультианалитных конъюгатов НКЗ с МКА к БТА и БТВ для построения на их основе мультианалитного ИХ-теста. Исследовались два варианта создания мультианалитных конъюгатов. Первый вариант заключался в смешивании моноаналитных конъюгатов к БТА и БТВ и нанесении их на подложку для конъюгата.

Второй – получение мультианалитного конъюгата НКЗ со смесью МКА к БТ обоих типов. Эксперименты показали, что ИХ-тесты, полученные с использованием первого варианта получения мультианалитного конъюгата, не обладали достаточной чувствительностью. Результаты анализа ботулинических анатоксинов с помощью ИХ-теста, сконструированного на основе мультианалитного конъюгата, полученного по второму варианту, приведены в таблице. Схема построения такого теста приведена на рисунке (Б).

Экспериментальные данные показывают, что чувствительность выявления мультианалитным тестом – 30 нг/мл ботулинического анатоксина типа А и 10 нг/мл ботулинического анатоксина типа В. Видно, что мультианалитный тест не уступает по своим характеристикам моноаналитным тестам. Время проведения ИХА, как и в случае моноаналитных тестов, не превышало 20–25 мин.

Специфичность моно- и мультианалитных ИХ-тестов подтверждена тем, что они не давали перекрестных реакций с ботулиническим анатоксином типа Е, столбнячным и дифтерийным анатоксинами, взятых в концентрации 1000 нг/мл.

Представилось интересным выяснить возможность определения БТ в продуктах питания с помощью разработанных ИХ-тестов. Известно, что некоторые продукты питания могут содержать БТ, образовавшиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов [2]. При выявлении аналита с помощью ИХА велико влияние матрикса вещества, в котором он находится. Примененная нами схема пробоподготовки была направлена на полноценную экстракцию БТ в жидкую фазу, понижение вязкости образца, уменьшение содержания солей и твердых частиц в

Результаты выявления ботулинических анатоксинов с помощью мультианалитного ИХ-теста

Наименование анатоксина	Концентрация анатоксинов в БА, нг/мл	Интенсивность окрашивания тестовых и контрольной зон, отн. ед.		
		Т ₁	Т ₂	К
БТА	0	0	0	8,5
	30	1,2	0	8,2
	60	2,1	0	9,9
	160	2,3	0	8,3
	320	6,5	0	9,3
	640	5,9	0	7,9
БТВ	0	0	0	8,5
	10	0	2,0	7,2
	25	0	2,2	9,4
	50	0	3,0	9,1
	75	0	5,1	9,2
	100	0	3,9	10,9
Смесь БТА и БТВ	0/0	0	0	10,0
	30/25	1,4	2,6	10,5
	60/25	2,9	4,4	11,4
	160/10	3,8	2,0	11,2
	160/25	3,9	1,7	7,0
	160/50	4,6	4,1	7,6

Примечание. Даны средние значения интенсивности окрашивания зон для трех измерений каждой концентрации анатоксинов.

обработанном образце продуктов питания и поддержание уровня рН, при котором иммунохроматографический процесс был эффективен. В работе [11] предложена с целью понижения вязкости и уменьшения негативных эффектов при анализе жирных и липидосодержащих образцов обработка их метанолом. Примененная нами экстракция жиров и липидов метанолом из образцов пищи не увеличила чувствительности выявления БТ, однако обработка ультразвуком позволила эмульгировать жиры и анализировать даже такие образцы. Для того чтобы проверить возможность разрушения БТ при обработке образцов пищи ультразвуком, проводили озвучивание модельных растворов анатоксинов в БА. Воздействие ультразвука на анатоксины в БА при тех же мощностях и частоте, что и при воздействии на пищу, не привело к их деградации и не понижало чувствительность.

Чувствительность выявления БТ в продуктах питания зависит от состава и консистенции продукта. Наибольшую чувствительность (10–30 нг/мл) наблюдали при анализе соков и минеральной воды, наименьшую (200–440 нг/мл) – при анализе продуктов с высокой концентрацией жиров, липидов и углеводов (мясных консервов и сгущенного молока). Напиток «Кока-кола», по причине содержания в нем ортофосфорной кислоты, и образцы вяленой рыбы, содержащей значительное количество поваренной соли, показали ложноположительные результаты ИХА.

Сконструированные нами моно- и мультианалитные ИХ-тесты позволяют за короткое время определить БТ типов А и В как в нативном виде, так и в модельных смесях в продуктах питания. Чувствительность ИХ-тестов по БТ (10–30 нг/мл) уступает биологическим тестам с использованием мышей (0,01 нг/мл) и ТИФА (0,1–1,0 нг/мл), зато сокращает время и существенно упрощает технику самого анализа [11]. ИХ-тест не требует приборного оснащения для регистрации результатов. Применение ИХ-тестов сокращает время анализа (20–25 мин по сравнению с 2–3 ч для ТИФА) и удобно с точки зрения лабораторной техники. Наконец, ИХ-тесты могут применяться в лабораториях с невысокой приборной оснащенностью и даже в полевых условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поздеев О.К. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. 768 с.
2. Ракова И.Д., Гуржей С.Н., Сметанин Н.Н. О методах исследования на ботулизм. Мед. экстремальных ситуаций. 2010; 33(3):71–3.
3. Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S. et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 2001; 285:1059–70.
4. Fach P., Gibert M., Griffais R., Guillou J.P., Popoff M. R. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61:389–92.
5. Ferreira J.L., Maslanka S., Johnson E., Goodnough M. Detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. J. AOAC Int. 2003; 86:314–31.
6. Frens G. Preparation of gold dispersions of varying particle size: Controlled nucleation or the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. Nat. Phys. Sci. 1973; 241(1):20–2.
7. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. Academic Press; 2008. P. 924–34.
8. Horisberger M., Rosset J. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. J. Histochem. Cytochem. 1977; 25(4):295–305.
9. Geoghegan W.D., Ackerman G.A. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. J. Histochem. Cytochem. 1977; 25:1187–200.
10. Niemann H. Molecular biology of the clostridial neurotoxins. In: Alouf J.E., Freer J.H., editors. A sourcebook on bacterial protein toxins. Academic Press, London, United Kingdom; 1991. P. 303–8.
11. Sharma S.K., Eblen B.S., Bull R.L., Burr D.H., Whiting R.C. Evaluation of lateral-flow *Clostridium botulinum* neurotoxin detection kits for food analysis. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(7):3935–41.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Pozdeev O.K. [Medical Microbiology]. M.: GEOTAR-Media; 2007. 768 p.
2. Rakova I.D., Gurzhey S.N., Smetanin N.N. [About the botulism diagnostic techniques]. Med. Ekstrem. Sit. 2010; 33(3):71–3.

Authors:

Shilenko I.V., Titov A.A., Yarkov S.P., Zlobin V.N. State Research Institute of Biological Device Engineering, Volokolamskoye Highway, 75, B. 1, Moscow, 125424, Russia. E-mail: niibp@dol.ru

Об авторах:

Шиленко И.В., Титов А.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. 125424, Москва, Волоколамское шоссе, д. 75, корпус 1. E-mail: niibp@dol.ru

Поступила 03.12.10.