

В.Г.Германчук, Д.В.Уткин, С.А.Щербакова

## АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ И СРЕДСТВ ЭКСПРЕССНОЙ ИНДИКАЦИИ ТОКСИНОВ

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Угроза возникновения чрезвычайных ситуаций различного характера является по-прежнему актуальной проблемой для всех государств мирового сообщества, не исключая и Российскую Федерацию. Разработка современных методов и средств экспрессной индикации и идентификации токсинов на сегодняшний день занимает одно из приоритетных мест в системе биологической защиты. Регламентированные средства обнаружения биологических токсинов не удовлетворяют требованиям экспрессности. Одними из перспективных средств экспрессной индикации токсинов являются иммунохроматографические, иммуночиповые и иммуносенсорные тест-системы, обладающие высокой чувствительностью, избирательностью и экспрессностью. В обзоре представлены зарубежные и отечественные разработки средств экспрессной индикации токсинов.

*Ключевые слова:* токсины, ботулинический токсин, стафилококковый энтеротоксин, холерный токсин, рицин, иммунохроматография, иммуночипы, иммуносенсоры, наноматериалы

V.G.Germanchuk, D.V.Utkin, S.A.Shcherbakova

### Analysis of the Modern Methods and Means for Rapid Toxin Indication

*Russian Research Anti-Plague institute "Microbe", Saratov*

The risk of occurrence of emergency situations different in their character is still a pressing issue for all the states of the world's community, including the Russian Federation. Nowadays, development of the modern methods and tools for rapid toxin detection and identification holds a high position in biological safety system. Specified means for biological toxin detection do not comply with the requirements of rapidness. One of the prospective means for rapid toxin indication is immune-chromatographic, immunochip, and immunosensor test-systems with high sensitivity, differentiation capacity and expression. In this review described are some up-to-date foreign and home-grown technologies for rapid toxin indication.

*Key words:* toxins, botulinum toxin, staphylococcal enterotoxin, cholera toxin, ricin, immune-chromatography, immunochips, immunosensors, nanomaterials.

В настоящее время угроза возникновения чрезвычайных ситуаций различного характера является актуальной проблемой для всех государств мирового сообщества [3, 17]. Сохраняется потенциальная опасность применения патогенных биологических агентов (ПБА) в качестве агентов биотерроризма [3, 4, 12, 15]. Перечень ПБА, включаемых специалистами в группу возможных биологических средств, которые с большой степенью вероятности могут быть использованы с террористической целью, в настоящее время расширен за счет возбудителей вирусного происхождения и биологических токсинов. В 1988 г. Министерством здравоохранения СССР был утвержден перечень агентов, в отношении которых необходимо создавать средства защиты и проводить защитные мероприятия. К их числу относят токсины растительного и животного происхождения: ботулинические, столбнячный, сибиреязвенный, шигеллезный токсины, стафилококковые энтеротоксины, рицин, нейротоксины и др. [2]. Интерес к токсинам вызван целым рядом преимуществ перед возбудителями инфекционных болезней. Они более стабильны при хранении и применении, их можно легко и в больших количествах получить в научно-исследовательских лабораториях, возможно скрытое применение в диверсионно-террористических целях, и, что особенно важно, практически отсутствует инкубационный период заболевания, что приближает токсины по тактическим характеристикам к химическим агентам. В связи с этим разработка

современных методов и средств экспрессной индикации и идентификации биологических токсинов занимает одно из приоритетных мест в системе биологической защиты. Ее успешное решение необходимо для обеспечения своевременности и эффективности всего комплекса противоэпидемических и лечебно-профилактических мероприятий. Ботулинический, холерный, столбнячный, стафилококковый токсины, рицин, согласно регламенту, входят в перечень агентов, выявляемых в лабораториях специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ). В связи с этим лаборатории СПЭБ должны быть обеспечены методами и средствами их индикации.

В соответствии с действующими нормативно-методическими документами для выявления и идентификации ботулинических токсинов используют постановку биологической пробы на белых мышах, для определения стафилококковых энтеротоксинов применяют иммуноферментные тест-системы отечественного и зарубежного производства [2, 16]. Рицин обнаруживают в реакции агглютинации эритроцитов. В настоящее время зарегистрированные тест-системы для выявления холерного токсина отсутствуют. Продукцию холерного токсина культурами холерного вибриона определяют на модели кроликов-сосунков. Постановка биопробы на ботулотоксин занимает от 1 до 72 ч, твердофазный иммуноферментный анализ на стафилококковые энтеротоксины – 6 ч, определение рицина занимает порядка 2 ч, кроликов-сосунков наблюдают 48 ч. Модернизация СПЭБ на современном

## Коммерческие системы индикации биологических токсинов

Методический подход	Коммерческие системы	Производитель	Вид определяемого токсина	Чувствительность, нг/мл	Время ответа, мин	Специфичность, %	Вид материала	Источник	
Иммунохроматографический анализ	BADD	Osborn Scientific	БТ, СЭТ, рицин	5–33	1	99	Жидкие, твердые пробы, смывы, пробы воздуха	[8,10]	
	SMART-II	New Horizons Diagnostic, Inc.	БТ, СЭТ, рицин	50	15–30	95	Жидкие, твердые пробы, смывы, культура, кровь, фекалии	[8, 10]	
	Prime Alert	GenPrime, Inc.	БТ, СЭТ, рицин	400	15	100	Порошки	[8]	
	Инструментальный учет	BioThreat Alert	Tetracore	БТ, СЭТ, рицин	2,5–50	1–15	95	Жидкие, твердые пробы, пробы воздуха, порошки, продукты питания	[8, 10]
		RAMP	Response Biomedical Corp.	БТ, рицин	5–10	15	100	Жидкие, твердые пробы, смывы, пробы воздуха	[8]
		Guardian Reader System	Alexeter Technologies	БТ, СЭТ, рицин	5–20	15	95	Жидкие, твердые пробы, смывы, пробы воздуха	[8]
Иммуночипы	Hand Held Microarray Assay (HHMA)	ANP Technologies, Inc.	БТ, СЭТ, рицин	1–25	15	НД	Жидкие, твердые пробы, смывы	[8]	
Иммуносенсоры	Analyte 2000	Research International Inc.	ХТ, СЭТ, рицин	0,1–1	15	НД	Жидкие пробы, суспензии	[8, 10]	
	RAPTOR	Research International Inc.	БТ, ХТ, СЭТ, рицин	0,1–1	15	100	Твердые пробы, смывы, пробы воздуха	[8, 10]	
	M-SERIES	BioVeris Corp.	БТ, СЭТ, рицин	0,0005–10	15	100	Жидкие, твердые пробы, смывы, пробы воздуха, кровь, сыворотка, плазма, фекалии, продукты питания	[8, 10]	

Примечание: БТ – ботулинический токсин, СЭТ – стафилококковый энтеротоксин В, ХТ – холерный токсин, НД – нет данных.

этапе предполагает разработку и внедрение в практику новых экспрессных методов и средств индикации биологических токсинов, основанных на достижениях науки и техники, характеризующихся быстротой постановки анализа, удобством в обращении, портативностью, низкой себестоимостью.

Среди методических и инструментальных подходов экспрессной индикации биологических токсинов на сегодняшний день можно выделить иммунохроматографические тест-системы, иммуночипы и иммуносенсоры (таблица). Указанные системы представляют собой портативные высокочувствительные экспресс-анализаторы, не требующие, как правило, каких-либо вспомогательных операций.

В настоящее время для выявления биологических токсинов (ботулинического, стафилококкового энтеротоксина, рицина) рядом зарубежных фирм выпускаются наборы для иммунохроматографического анализа (BADD, SMART-II, Prime Alert и др.). Преимущества иммунохроматографических тест-систем заключаются в экспрессности – возможности получения ответа в течение 10–15 мин, простоте постановки анализа, возможности визуального учета результатов и использования в полевых условиях. Выполнение исследований не требует специализированного оборудования, тест-системы малогабаритны и легко комплектуются в виде укладки (рис. 1). Представленные данные указывают на перспективность использования иммунохроматографических тест-систем в оснащении специализированных про-

тивовидемиических бригад. Повысить чувствительность и объективность визуального иммунохроматографического анализа можно за счет использования флуоресцентных и фосфоресцентных меток и приборного обеспечения регистрации флуоресценции. Этот подход реализован при создании систем RAMP (Response Biomedical Corp., Канада), BioThreat Alert (Tetracore, США), Guardian Reader System (Alexeter Technologies, США).

Они предназначены для использования в мобильных лабораториях. Все существующие известные укладки функционально идентичны: они анализируют пробу, отобранную из внешней среды путем взятия мазков, сбора неизвестных подозрительных порошков и капель жидкости, в последующем растворяют их в так называемом «буфере анализа» (определенный состав водного раствора солей, детергентов и белка) и переносят часть полученного раствора (или взвеси частиц) на индикаторный элемент (тест-полоску). Затем, после прохождения реакции, на поверхности индикаторного элемента появляются окрашенные полосы, которые свидетельствуют о наличии искомого микроорганизма или токсина в пробе. Недостатком существующих иммунохроматографических тест-систем является наличие ложноположительных результатов, связанных с присутствием в пробах из окружающей среды различных природных кислот, щелочей, детергентов, пылевых частиц, которые могут вызывать появление на тест-полоске окрашенных полос, даже в от-



Рис. 1. Устройство для детекции агентов биологического оружия (Osborne Scientific, США) [8]

сутствие искомого биологического агента. Указанная проблема была решена отечественными специалистами при создании укладки иммунохроматографических индикаторных элементов для выявления возбудителей особо опасных инфекционных болезней и токсинов УИХЭ (ФГУП ГосНИИБП ФМБА, Россия). В дополнение к основным индикаторным элементам для выявления микроорганизмов и токсинов укладка содержит один иммунохроматографический элемент для выявления примесей и исключения ложноположительных результатов [6].

Одна иммунохроматографическая тест-полоска рассчитана для выявления только одного вида микроорганизма или токсина. Множественный параллельный анализ на наличие нескольких видов токсинов может быть осуществлен при использовании технологии иммуночипов. Иммуночип представляет собой пластинку из стекла, кремния, нитроцеллюлозной мембраны, на которой в определенном порядке нанесены от нескольких до десятков видов специфических антител. Преимущества микрочиповых систем связаны с их портативностью, низким уровнем ложноположительных результатов, сокращением времени анализа, возможностью определения множества аналитов в одном анализе. Иммуночиповые тест-системы для индикации биологических токсинов не так широко представлены на зарубежном и отечественном рынке, как иммунохроматографические. Коммерческим является иммуночип ННМА (ANP Technologies, Inc., США), представляющий собой иммунохроматографическую тест-полоску с нанесенными в виде отдельных точек антителами, он прост в обращении и позволяет обнаружить интересующие токсины в течение 15 мин (таблица) [8]. Однако для большинства иммуночипов требуется наличие у персонала определенных навыков постановки иммунологического анализа и приборного обеспечения регистрации и учета результатов – ридера или сканера. L.C.Shriver-Lake *et al.* [19] разработали мультианалитический микрочип Multi-Analyte Array Biosensor (МААВ), детектирующий менее чем за 15 мин столбчатый, ботулинический, стафилококковый токсины и рицин в одном анализе. В Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН были разработаны белковые иммуночипы для одновременного выявления стафилококкового, дифтерийного, столб-

чатого, сибиреязвенного токсинов, рицина и вискумина в концентрации 0,1–2 нг/мл (рис. 2) [5, 18]. Однако они пока не внедрены в практику.

Французские ученые разработали удобный способ обнаружения ботулинического токсина типа В, основанный на определении протеазной активности ботулотоксина, субстратом которого служит ассоциированный с везикулами мембранный белок VAMP2 (синамбревин). Анализ выполняется на белковом чипе, где иммобилизованы везикулы посредством моноклональных антител к белку [7].

Среди систем многопараметрического анализа следует отметить автономную систему детекции патогенов APDS – Autonomous Pathogen Detection System (Lawrence Livermore National Laboratory, США), сочетающую в себе молекулярно-генетический и иммунологический анализ на основе хМАР-технологии (Luminex, США) [9]. Система APDS осуществляет непрерывный мониторинг воздуха на наличие 11 видов патогенных биологических агентов, в том числе ботулинического токсина.

Наряду с иммунохроматографическими и иммуночиповыми системами для детекции биологических токсинов используются различные иммуносенсорные устройства: Analyte 2000, RAPTOR, M-SERIES и др. (таблица). Потенциальное использование иммуносенсоров, особенно при мониторинге состояния окружающей среды, в большей степени ориентировано на системы предупреждения и получения сигнала ответа, не требующие точного определения концентрации ПБА. Принцип действия иммуносенсоров основан на взаимодействии биологических молекул иммуносенсора (антител, антигенов) с исследуемым материалом, в результате чего изменяются оптические, электрохимические и другие характеристики среды, которые регистрируются с помощью физического преобразователя этих изменений в электрический сигнал [1]. Достоинства иммуносенсоров заключаются в способности преобразовывать различные виды энергии, в высокой избирательности и чувствительности, возможности обнаружения ионных примесей, простых и сложных неорганических и органических молекул. Применение иммуносенсоров в экспресс-индикации биологических токсинов позволит на 2–3 порядка повысить чувствительность анализа по сравнению с другими иммунологическими методами, специфичность, сократить время анализа до нескольких минут. Так, система RAPTOR (Research International Inc., США) и ее предшественник Analyte 2000 (Research International Inc., США), созданные на основе оптоволоконного иммуносенсора, детектиру-

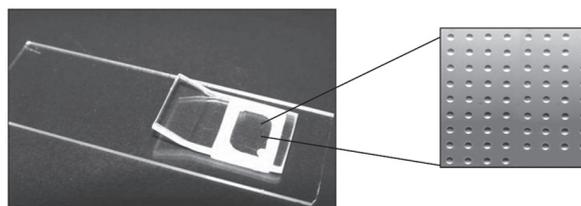


Рис. 2. Биологический микрочип для определения биологических токсинов (ИМБ им. В.А.Энгельгардта РАН, Россия) [18]

ют ботулинический токсин, стафилококковый энтеротоксин, холерный токсин и рицин в концентрации 0,1–1 нг/мл за 1 мин. Электрохемилюминесцентный анализ с применением системы M-SERIES (BioVeris Corp., США) повышает порог определения токсинов (ботулинического, стафилококкового) до 0,5–10 пг/мл [8]. Американские специалисты также сконструировали оптический биосенсор для мультиплексного определения белковых маркеров патогенов с использованием квантовых точек, где на волноводе иммобилизованы связывающие антитела [13]. Представленные иммуносенсорные устройства являются довольно дорогостоящими и сложными в обращении. Они требуют предварительной подготовки прибора к работе, его калибровки в течение 30 мин и высококвалифицированного обслуживающего персонала. Устройства должны быть обеспечены компьютером, источником бесперебойного питания.

В последнее время ведутся работы по конструированию средств индикации биологических токсинов с применением нанотехнологий и наноматериалов, которые позволяют создавать высокочувствительные и, в то же время, малогабаритные устройства. Так, N.M.Nirankar *et al.* [14] для детекции токсина *Staphylococcus aureus* предложили использовать наноразмерные транзисторы из кремниевых нанопроводников. Покрыв поверхность транзистора соответствующим антителом, исследователи смогли детектировать стафилококковый токсин, образующий комплекс с антителом и меняющий параметры тока, протекающего через транзистор. Шведские ученые со специалистами из Таиланда разработали электрический иммуносенсор для детекции холерного токсина на субатомном уровне. Ультрасенсорность сенсора обусловлена наличием комплексного интерфейса на поверхности золотого электрода с использованием наночастиц [11]. M.Yang *et al.* [20] предложили для детекции стафилококкового энтеротоксина В электрохимический сенсор, действие которого основано на перколяции через сеть углеродных нанотрубок, модифицированных антителами и расположенными между серебряными электродами сенсора. М.Б.Раевым (2008 г.) на основе наночастиц коллоидного углерода были разработаны оригинальные тест-системы для определения ботулинического и столбнячного токсина.

Таким образом, в настоящее время, наряду с регламентированными методами определения биологических токсинов, существуют перспективные средства экспрессной индикации – иммунохроматографические, иммуночиповые и иммуносенсорные тест-системы. Представляет интерес разработка методов и средств индикации токсинов с использованием нанотехнологий и наноматериалов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики. Сенсор. 2002; 1:16–24.
2. Онищенко Г.Г. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство. М.: МП Гигиена; 2006. 288 с.

3. Онищенко Г.Г., Пальцев М.А., Зверев В.В., Иванов А.А., Киселев В.И., Нетесов С.В. и др. Биологическая безопасность. М: Медицина; 2006. 304 с.
4. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник Рос. акад. наук. 2003; 73(3):195–204.
5. Четчин В.Р., Прокопенко Д.В., Макаров А.А., Заседателев А.С. Биочипы для медицинской диагностики. Российские нанотехнологии. 2006; 1–2:13–28.
6. Ярков С.П., Третьяков С.И., Злобин В.Н. Укладка иммунохроматографических индикаторных элементов. Патент РФ 77687, опубл. 27.10.2008.
7. Ferracci G., Marconi S., Mazuet C., Jover E., Blanchard M.P., Seagar M., Popoff M., Lévêque C. A label-free biosensor assay for botulinum neurotoxin B in food and human serum. J. Anal. Biochem. 2011; 410(2):281–8.
8. Guide for the Selection of Biological Agent Detection Equipment for Emergency First Responders. 2nd ed. Guide 101–06 [Internet]. U.S. Department of Homeland Security, 2007. 421 p.. Available from: [http://www.nist.gov/customcf/get\\_pdf.cfm?pub\\_id=32499](http://www.nist.gov/customcf/get_pdf.cfm?pub_id=32499)
9. Hindson B.J., Makarewicz A.J., Setlur U.S., Henderer B.D., McBride M.T., Dzenitis J.M. Biosensors & Bioelectronics 2005; 20:1925–31.
10. Lim D.V., Simpson J.M., Kearns E.A., Kramer M.F. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and bio warfare. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18(4):583–607.
11. Loyprasert S., Hedström M., Thavarungkul P., Kanatharana P., Mattiasson B. Sub-attomolar detection of cholera toxin using a label-free capacitive immunosensor. J. Biosens., Bioelectr. 2010; 25(8):1977–83.
12. Madsen J.M. Toxins as weapons of mass destruction. Clin. Lab. Med. 2001; 21(3):593–605.
13. Mukundan H., Xie H., Grace W.K., Anderson A.S., Price D., Martinez J.S., Hartman N., Swanson B.I. Quantitative Multiplex Detection of Pathogen Biomarkers on Multichannel Waveguides. J. Anal. Chem. 2010; 82(1):136–44.
14. Nirankar N.M., Maki W.C., Cameron E., Nelson R., Winterrowd P., Rastogi S.K. *et al.* Ultra-sensitive detection of bacterial toxin with silicon nanowire transistor. Lab Chip. 2008; 8:868–71.
15. Reid D. Kirby. Potential military chemical/biological agents and compounds. US Army Chemical School. 2005. 324 p.
16. Reiss J., Reiss K. Recent advances in detection and identification of botulinum neurotoxins (BoNTs). J. Med. CBR Def [Internet]. 15 Jul 2007; Vol. 5. Available from: [http://www.jmedcbr.org/issue\\_0501/Reiss/Reiss\\_01\\_07.pdf](http://www.jmedcbr.org/issue_0501/Reiss/Reiss_01_07.pdf)
17. Roberts B., Moodie M. Biological weapons: towards a threat reduction strategy. National Defense University. Washington; 2002. 15 p.
18. Rubina A., Duykova V., Dementieva E., Stomakhin A., Nesmeyanov E., Grishin E. *et al.* Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. Anal. Biochem. 2005; 340(2):317.
19. Shriver-Lake L.C., Ligler F.S. IEEE Sensors Journal 2005; 5:751–56.
20. Yang M., Sun S., Bruck H. A., Kostov Y., Rasooly A. Electrical percolation-based biosensor for real-time direct detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB). J. Biosens. Bioelectr. 2010; 25(12):2573–8.

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

1. Karyakin A.A., Ulasova E.A., Vagin M.Yu., Karyakina E.E. [Biosensors: design, classification and functional characteristics]. Sensor. 2002; 1:16–24.
2. Onishchenko G.G. [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents. Guidelines]. M.: MP Gigena; 2006. 288 p.
3. Onishchenko G.G., Pal'tsev M.A., Zverev V.V., Ivanov A.A., Kiselev V.I., Netesov S.V. *et al.* [Biological Safety]. M.: Meditsina; 2006. 304 p.
4. Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V., Martyniuk R.A. [Bioterrorism: national and global threat]. Vestnik RAMS. 2003; 73(3):195–204.
5. Chechetkin V.R., Prokopenko D.V., Makarov A.A., Zasedatelev A.S. [Biochips for medical diagnostics]. Ros. Nanotekhnol. 2006; 1–2:13–28.
6. Yarkov S.P., Tret'yakov S.I., Zlobin V.N. [Packing of the immunochromatographic detecting elements]. RF Patent 77687.

#### Authors:

Germanchuk V.G., Utkin D.V., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

#### Об авторах:

Германчук В.Г., Уткин Д.В., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

Поступила 17.06.11.