

*Т.Ю.Загоскина, Е.А.Чапоргина, Е.Ю.Марков, Ю.О.Попова,
Т.М.Долгова, О.В.Гаврилова, Т.С.Тайкова, С.В.Балахонов*

ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ, МЕЧЕННЫХ НАНОЧАСТИЦАМИ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА, ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БОТУЛИНИЧЕСКОГО ТОКСИНА В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Конструирование тест-системы для дот-иммуноанализа с использованием наночастиц коллоидного золота в качестве маркера специфических антител для детекции ботулинического токсина в клиническом материале и пищевых продуктах. *Материалы и методы.* В качестве маркера специфических антител использовали наночастицы золота с диаметром частиц 20 нм. IgG выделяли из поливалентной сыворотки диагностической против ботулотоксинов типов А, В, С, Е, F производства НПО «Аллерген» (Ставрополь) активностью 5000 — 10 000 МЕ. Ботулотоксин в клиническом материале (сыворотки крови) от 3 больных с установленным клиническим диагнозом «ботулизм», а также пищевом продукте (солянка грибная домашняя) определяли методом дот-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране. *Результаты.* Во всех исследованных образцах (сыворотки крови от 3 больных и солянка грибная домашняя) обнаружен ботулинический токсин, который регистрировался у больного № 1 в разведении исследуемого образца 1:2112, у больного № 2 — 1:32, у больного № 3 — 1:1056, в пищевом продукте — 1:8. В отрицательном контроле (чистые культуры возбудителей дизентерии и кишечного иерсиниоза, сыворотках крови больного ОКИ и здорового человека, а также в консервированной фасоли в томатном соусе и консервированном зеленом горошке) ботулотоксин не обнаруживали. *Заключение.* Разработана высокочувствительная специфичная тест-система для дот-иммуноанализа на основе коммерческих противоботулинических антител, меченных частицами коллоидного золота, которая позволяет обнаруживать ботулотоксины в течение 2 ч в объеме 1 — 2 мкл исследуемого образца.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 31—35

Ключевые слова: ботулинический токсин, наночастицы золота, дот-иммуноанализ

*T. Yu. Zagoskina, E. A. Chaporgina, E. Yu. Markov, Yu. O. Popova,
T. M. Dolgova, O. V. Gavrilova, T. S. Taikova, S. V. Balakhonov*

DOT-IMMUNOASSAY USING GOLD NANOPARTICLE MARKED COLLOID GOLD FOR THE DETECTION OF BOTULINIC TOXIN IN CLINICAL MATERIAL AND FOOD PRODUCTS

Irkutsk Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Construction of test-systems for dot-immunoassay using colloid gold nanoparticles as a marker of specific antibodies for the detection of botulinic toxin in clinical material and food products. *Materials and methods.* 20 nm gold nanoparticles were used as a marker of specific antibodies. IgGs were isolated from polyvalent diagnostic sera against type A, B, C, E, F botulin toxins produced by SPC Allergen (Stavropol) with 5000 — 10 000 ME activity. Botulin toxin in clinical material (blood sera) from 3 patients with established botulism clinical diagnosis as well as food product (home-made mushroom soup solyanka) was determined by dot immunoassay on nitrocellulose membrane. *Results.* Botulin toxin was detected in all the studied samples (blood sera from 3 patients and the soup) that was registered in the patient No. 1 at the 1:2112 dilution of the studied sample, in patient No. 2 — 1:32, in patients No. 3 — 1:1056, in the food product — 1:8. Botulin toxin was not detected in the negative control (pure cultures of the dysentery causative agents and intestine yersinosis, blood sera of the patient with AII and a healthy individual, as well as canned beans in tomato sauce and canned green peas). *Conclusion.* A highly

sensitive specific test-system was developed for dot-immunoassay based on the commercial anti-botulin antibodies labelled with colloid gold particles that allows to detect botulin toxins within 2 hours in the sample volume of 1 — 2 µl.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 31—35

Key words: botulin toxin, gold nanoparticles, dot-immunoassay

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в связи с необходимостью обеспечения импортозамещения актуальны разработки простых, чувствительных и специфичных тест-систем с использованием отечественных реактивов и оборудования, пригодных для экспресс-детекции патогенов, в том числе в недостаточно оснащенных лабораториях, в полевых условиях, в работе санитарно-эпидемиологических бригад в режиме ЧС и т. п.

Технически подобные подходы представлены большим разнообразием иммунохроматографических, иммунофльтрационных и так называемых дот-блот методик, в которых в качестве твердой фазы используют соответствующие мембранные подложки, а в качестве маркеров — различные молекулярные метки: флуоресцирующие вещества, ферменты, золи тяжелых металлов (чаще — коллоидного золота) и дисперсные красители.

Использование препаратов коллоидного золота (КЗ) в твердофазных методах иммуноанализа находит достаточно широкое применение в лабораторной практике, в частности, для экспресс-диагностики некоторых особо опасных инфекционных болезней: чумы, бруцеллеза, туляремии, псевдотуберкулеза [1, 3, 4, 6]. Реализация этих методов осуществляется постановкой традиционного дот-иммуноанализа. Достоинством использования наночастиц КЗ являются возможность получения маркеров определенного заданного размера и соответственно использование их в качестве различных меток, что позволяет идентифицировать сразу 2–3 вещества на одном и том же объекте [8]. Процедура получения КЗ и его комплексов с антителами довольно проста, экспрессна, предусматривает использование одноэтапной методики приготовления диагностического препарата. Применение КЗ в твердофазных методах иммуноанализа основано на интенсивной красной окраске этого маркера, позволяющей определять результаты реакции визуально. Более того, чувствительность анализа можно повысить, используя технику усиления окрашивания адсорбированного на мембране золота серебром. Этот эффект основан на реакции, применяемой в фотографии и получившей название «физического проявления» [5]. КЗ катализирует восстановление ионов серебра (из соли) до металлического серебра. Образующаяся вокруг частиц золота оболочка металлического серебра, в свою очередь, ускоряет восстановление золота, и реакция становится автокаталитической, при этом чувствительность анализа повышается на порядок [2].

Ботулинические токсины (БТ) — яды биологического происхождения II группы патогенности — с высокой вероятностью могут быть использованы в качестве поражающих агентов при совершении актов биологического и химического терроризма. Люди чрезвычайно чувствительны к ботулотоксинам.

Детекцию ботулотоксинов согласно схеме проведения специфической индикации осуществляют двумя методами: постановкой реакций пассивной гемагглютинации (РПГА) и биологической нейтрализации токсина на мышах

(РБНТ) с использованием диагностических противоботулинических поли- и моновалентных сывороток типов А, В, С, Е и F. Ориентировочный ответ в РБНТ выдается через 2 суток, окончательный — через 4 — 8 суток. К сожалению, в ряде случаев отсутствует возможность проведения работ с лабораторными животными, да и сроки получения результатов в РБНТ длительны. В связи с ограниченной разрешающей способностью агглютинационных методов диагностики, в РПГА не всегда удается обнаружить небольшое количество токсина в клиническом материале, положительном в РБНТ.

Цель исследования — конструирование тест-системы для дот-иммуноанализа с использованием наночастиц коллоидного золота в качестве маркера специфических антител для детекции ботулинического токсина в клиническом материале и пищевых продуктах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника специфических антител использовали цельную сыворотку диагностическую противоботулиническую поливалентную против типов А, В, С, Е, F производства НПО «Аллерген» (Ставрополь) активностью 5000 — 10 000 МЕ, из которой выделяли фракцию иммуноглобулина G (IgG) комбинированным методом с использованием каприловой кислоты и сульфата аммония [7].

Для получения золя коллоидного золота с диаметром частиц 20 нм, наиболее подходящего для использования в качестве диагностикума в ДИА, 0,01% раствор золотохлористоводородной кислоты доводили до кипения, добавляли установленное количество свежеприготовленного 1% раствора цитрата натрия, кипятили 10 мин. Цвет раствора при этом изменялся от бледно-желтого и бледно-голубого до цвета красного вина. По завершении процесса восстановления золота цвет раствора стабилен.

Получение комплекса коллоидного золота с противоботулиническими антителами (диагностикум) проводили при легком перемешивании на магнитной мешалке в течение 5 мин при $22 \pm 2^\circ\text{C}$ добавлением к раствору IgG золя золота. Далее последовательно с интервалом в 5 мин добавляли 0,5% водный раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ-20 000) и 1% бычий сывороточный альбумин (БСА), перемешивая дополнительно 5 минут. Очистку диагностикума от непрореагировавших компонентов проводили центрифугированием (15 000x g, 15 мин). Осадок суспендировали в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,2 мг/мл ПЭГ-20 000; 0,15 М NaCl; 0,1% БСА и 0,1% азида натрия.

Постановку дот-иммуноанализа и учет результатов осуществляли следующим образом: исследуемый материал наносили в виде капель объемом 1 — 2 мкл на мембранный фильтр, заранее обработанный в течение 1 ч при комнатной температуре поливалентной диагностической противоботулинической сывороткой в разведении 1:100, мембрану подсушивали на воздухе в течение 10 — 15 мин, помещали в чашку Петри и дважды промывали забуференным физиологическим раствором pH 7,2, содержащим 0,05% твина 20 (ФБР-твин). Далее фильтр погружали на 30 мин в 2% раствор БСА на ФБР, блокируя возможные свободные участки на иммуносорбенте. После последующего двукратного промывания ФБР-твином «заблокированный» мембранный фильтр погружали на 1 час в приготовленный диагностикум — раствор IgG из поливалентной противоботулинической сыворотки, меченный коллоидным золотом (IgG=КЗ). Затем мембранный фильтр дважды промывали дистиллированной водой и один раз 0,2 М цитратным буфером pH 3,7. Учет результатов

реакции проводили после погружения на 5 — 10 мин в раствор проявителя (0,11 г лактата серебра, растворенного в 1 мл дистиллированной воды, добавленного в 0,85% раствор гидрохинона в 0,2 М цитратном буфере pH 3,7). Из-за светочувствительности лактата серебра реакцию рекомендуется проводить в темноте. Операцию останавливали погружением мембраны на 5 мин в раствор фотографического фиксажа (гипосульфит натрия) с последующим промыванием дистиллированной водой и подсушиванием на воздухе.

Регистрация результатов ДИА — визуальная. В исследуемых образцах, содержащих ботулинический токсин, и в параллельно поставленном положительном контроле (заведомо положительный материал от больных с установленным клиническим диагнозом «ботулизм») формировались четкие окрашенные в разные оттенки серого цвета пятна. При отсутствии в исследуемых образцах ботулотоксина и в отрицательном контроле окрашенных пятен не было, мембрана оставалась белой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Испытание тест-системы для ДИА проводилось на клиническом материале (сыворотки крови) от 3 больных с установленным клиническим диагнозом «ботулизм», а также пищевом продукте (солянка грибная домашняя). Согласно направлению на исследование, это были члены одной семьи, употреблявшие в пищу консервированный продукт собственного изготовления.

В качестве отрицательного контроля использованы пищевые продукты (консервированная фасоль в томатном соусе, консервированный зеленый горошек), чистые культуры *Shigella flexneri* 6850 и *Yersinia enterocolitica* И-76 и клинический материал (сыворотка крови больного ОКИ и здорового человека).

В ходе постановки дот-иммуноанализа во всех исследованных образцах (сыворотки крови от 3 больных и солянка грибная домашняя) обнаружен ботулинический токсин, проявляющийся на мембране в местах нанесения проб в виде темно-серых пятен: ботулинический токсин регистрировался у больного № 1 в разведении исследуемого образца 1:2112, у больного № 2 — 1:32, у больного № 3 — 1:1056, в пищевом продукте — 1:8. Общее время проведения анализа составило около 2 часов. В отрицательном контроле (чистые культуры возбудителей дизентерии и кишечного иерсиниоза, сыворотках крови больного ОКИ и здорового человека, а также в консервированной фасоли в томатном соусе и консервированном зеленом горошке) ботулотоксин не обнаруживался, что свидетельствовало о высокой специфичности разработанной тест-системы. Параллельно этот материал исследовался в РБНТ. Нами отмечено, что результаты, полученные в ДИА, полностью совпадали с результатами реакции биологической нейтрализации токсина на мышах.

Разработанная нами тест-система для дот-иммуноанализа на основе коммерческих противоботулинических антител, меченных частицами коллоидного золота, проста в приготовлении, не требует дорогостоящего приборного обеспечения, эффективна при определении ботулинического токсина в клиническом материале и пищевом продукте, ДИА с ее использованием демонстративен, позволяет обнаруживать ботулотоксины в течение 2 ч в объеме 1 — 2 мкл исследуемого образца, высокочувствителен (положительные результаты в дот-иммуноанализе полностью совпадали с положительными результатами РБНТ, чувствительность которой при выявлении ботулинического токсина, по данным литературы, составляет 40 пг) и специфичен (отсутствие перекрестного реагирования с чистыми культурами возбудителей дизентерии

и кишечного иерсиниоза, сыворотками крови от больного ОКИ и здорового человека, с качественными пищевыми продуктами).

ЛИТЕРАТУРА

1. Загоскина Т.Ю., Балахонов С.В., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Субычева Е.Н., Чапоргина Е.А., Михайлов Е.П., Бодрых О.Б., Попова Ю.О. Апробация диагностических тест-систем с использованием наночастиц серебра в качестве маркеров специфических антител для скрининга исследуемого материала на наличие антигенов возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии и ботулотоксина в дот-иммуноанализе. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 4: 61-64.
2. Загоскина Т.Ю., Голубинский Е.П., Меринов С.П., Полтавченко А.Г., Марков Е.Ю. Современные подходы к конструированию диагностических тест-систем с использованием неорганических корпускулярных меток. Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2004, 1 (2): 176-180.
3. Загоскина Т.Ю., Калиновский А.И., Марков Е.Ю., Докорина А.А., Голубинский Е.П. Использование специфических антител, меченных частицами коллоидного серебра, для выявления антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа. Клиническая лабораторная диагностика. 2002, 6: 38-39.
4. Загоскина Т.Ю., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Попова Ю.О., Марков Е.Ю., Старикова О.А. Конструирование тест-системы с наночастицами коллоидного серебра для обнаружения возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в дот-иммуноанализе. Журн. микробиол. 2017, 1: 55-61.
5. Картужанский А.Л., Красный-Адмони Л.В. Химия и физика фотографического процесса. Л., Химия, 1987.
6. Носкова О.А., Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Гриднева Л.Г., Михайлов Е.П. Применение дот-иммуноанализа для выявления антигенов чумного микроба в полевом материале. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 3: 69-71.
7. McKinney M.M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. J. Immunol. Meth. 1987, 96 (2): 271-278.
8. Panfilova E., Shirokov A., Khebtsov B. et al. Multiplexed dot immunoassay using Ag nanocubes, Au/Ag alloy nanoparticles, and Au/Ag nanocages. Nano Research. 2012, 5 (2): 124-134.

Поступила 10.03.17

Контактная информация: Загоскина Татьяна Юрьевна, д.м.н., 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р.т. (3952)22-01-39

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*М.Л.Леденева¹, А.С.Водопьянов², Г.А.Ткаченко¹,
С.О.Водопьянов², С.С.Савченко¹, И.М.Шпак¹*

ВЫЯВЛЕНИЕ INDEL-МАРКЕРОВ В ГЕНОМАХ ШТАММОВ BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ДЛЯ ВНУТРИВИДОВОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

¹Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, ²Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Поиск потенциальных INDEL-маркеров в геномах штаммов Burkholderia pseudomallei, а также оценка возможности их использования для внутривидового генотипирования. *Материалы и методы.* Изучены полногеномные последовательности 25 штаммов B. pseudomallei с известными географическими регионами выделения из базы данных GenBank. Поиск INDEL-маркеров осуществляли с использованием авторского программного обеспечения GeneExpert. Кластерный анализ проводили с помощью генетической дистанции по R. Sokal и C. Michener и метода ближайшего связывания. *Результаты.* Выявлено 11 INDEL- маркеров, которые позволили разделить исследуемые штаммы на