

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 612.017.576.8.077.3+616.981.558

Т.Ю. Загоскина, Е.А. Чапоргина, Е.Ю. Марков, Ю.О. Попова, С.Ю. Соловьев, Н.М. Андреевская,
С.В. Балахонов

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СКРИНИНГА МАТЕРИАЛА НА БОТУЛОТОКСИН В ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗЕ

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск,
Россия

Подобраны условия лиофилизации иммунных реагентов, используемых для приготовления тест-системы для дот-иммуноанализа на ботулотоксин, позволяющего в течение около 2 ч детектировать БТ в исследуемых образцах. Сохраняется высокая чувствительность, специфичность анализа, повышается стабильность препаратов (увеличиваются сроки хранения), удобство использования в условиях работы в режиме ЧС, в частности, в условиях работы мобильных автолабораторий эпидразведки.

Ключевые слова: специфические иммуноглобулины, коллоидное серебро, дот-иммуноанализ, ботулотоксин

IMPROVEMENT OF A TEST-SYSTEM FOR THE BOTULINUS TOXIN SCREENING IN DOT-IMMUNOANALYSIS

T.Yu. Zagoskina, E.A. Chaporgina, E.Yu. Markov, Yu.O. Popova, S.Yu. Solovyev,
N.M. Andreevskaya, S.V. Balakhonov

Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russia

We constructed a test system for dot-immunoassay (DIA) to accelerate definition and identification of botulinus toxins and also to refuse from application of laboratory animals for routine screening of clinical samples, foodstuff and environments. This system permitted to detect botulinus toxin during approximately 2 h in the tested samples. Sensitivity of this DIA in some cases exceeded the mice biotest. This improved method has minimum reaction to nonspecific exposures from the investigated biological substrata. It is simple to conduct. It is high efficient and expressive, does not require to use expensive equipment and the reactants, special training for the personnel. Lyophilization conditions for the immune reagents used for the test system preparation for botulinus toxin dot-immunoassay were selected. High sensitivity, specificity of the analysis are remained, stability of the preparations (periods of storage) is increased. This method is convenient to use in field conditions at extreme situations, in particular, in mobile autolaboratories for epidemiological survey.

Key words: specific immunoglobulins, colloid silver, dot-immunoanalysis, botulinus toxin

ВВЕДЕНИЕ

Ботулинические токсины (БТ) – яды биологического происхождения II группы патогенности, с высокой вероятностью могут быть использованы в качестве поражающих агентов биотерроризма.

С целью ускорения процедуры определения и идентификации ботулотоксинов, а также отказа от использования лабораторных животных для рутинного скрининга клинического материала, пищевых продуктов и объектов окружающей среды нами сконструирована тест-система для дот-иммуноанализа (ДИА), позволяющая в течение около 2 ч детектировать БТ в исследуемых образцах [2]. Разработанный ДИА в ряде случаев превосходит по чувствительности биотест на мышах, минимально реагирует на неспецифические воздействия со стороны исследуемых биологических субстратов, прост в постановке, имеет высокую производительность и экспрессность, не требует использования дорого-

стоящего оборудования и реактивов, специальной подготовки персонала [1].

При конструировании тест-системы нами ранее были подобраны способы выделения и очистки специфических иммуноглобулинов G (IgG) из коммерческих поливалентных и моноспецифических противоботулинических сывороток, применяемых в реакции биологической нейтрализации токсина (РБНТ) и обеспечивающих высокую чувствительность его обнаружения; оптимизированы условия связывания IgG с наночастицами коллоидного серебра размером 5–9 нм; подобран временной и температурный режимы проведения всех этапов дот-иммуноанализа [2]. Однако приготовленные *ex tempore* иммунные реагенты, входящие в состав тест-системы, находились в жидком состоянии, и, несмотря на добавление в них консерванта (азид натрия), сроки хранения и эффективного использования ограничивались 1 неделей.

Цель работы: подбор условий для проведения лиофильного высушивания иммунных реагентов, используемых в тест-системе для ДИА на ботулотоксин, с сохранением их специфической и каталитической активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве стабилизаторов используемых специфических IgG и диагностического препарата (IgG, меченные частицами коллоидного серебра) перед проведением их лиофильного высушивания испытаны две рецептуры, включающие: I – сахарозу с тиосульфатом натрия; II – поливинилпирролидон (ПВП) с сахарозой. Навески ингредиентов соответствующей концентрации растворяли в дистиллированной воде, смешивали с равными объемами иммунных реагентов, разливали в круглодонные колбы (раствор диагностикума) или пенициллиновые флаконы (раствор IgG), замораживали в жидком азоте и высушивали в аппарате для лиофильной сушки «Freesemobile 6» в течение 24 ч. Аналогичным образом лиофилизировали указанные иммунные реагенты без добавления стабилизаторов.

Леофилизаты хорошо, без осадка растворялись в дистиллированной воде в течение 1 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментов установлено, что оба стабилизатора практически равноценны, тем не менее, более четкие результаты в ДИА получены при использовании стабилизатора с сахарозой и тиосульфатом натрия [1]. При использовании регидратированных специфических противоботулинических IgG и диагностического препарата, лиофилизированных без стабилизатора, в дот-иммуноанализе формировались менее четкие, более светлые пятна в местах нанесения исследуемых образцов.

С использованием стабилизатора I проведено лиофильное высушивание 5 партий иммуноглобулинов, выделенных из специфических поливалентной и монорецепторных A, B, E противоботулинических сывороток, и 5 серий диагностикумов, сконструированных с использованием IgG, выделенных из указанных сывороток, меченных частицами коллоидного серебра. Перед постановкой ДИА леофилизаты растворяли в требуемом объеме дистиллированной воды и использовали согласно схеме постановки анализа.

Постановка ДИА включала адсорбцию исследуемого материала, содержащего ботулотоксин, на нитроцеллюлозном мембранном фильтре, нагруженном регидратированными специфическими противоботулиническими IgG, блокирование свободных участков связывания раствором инертного белка, детекцию адсорбированного токсина с помощью регидратированных специфических IgG, меченных наночастицами коллоидного серебра (диагностический препарат), визуализацию результатов раствором проявителя [2]. Пробы, содержащие токсин, проявлялись на мембране в местах нанесения образцов в виде темно-серых пятен. В качестве отрицательных контролей использованы объекты

окружающей среды (земля), пищевые продукты (рыба холодного копчения), клинический материал (рвотные массы, промывные воды желудка больного с диагнозом дизентерия) и разводящая жидкость. В отрицательных контролях и материале, не содержащем ботулинический токсин, окрашивания пятен не происходило.

Испытания каждой партии леофилизированных компонентов тест-систем на обнаружение ботулотоксина проведены на клиническом материале (рвотные массы, промывные воды желудка, испражнения, кровь, моча), полученном от 5 больных с установленным клиническим диагнозом ботулизма, госпитализированных в городскую инфекционную больницу. Время проведения анализа составляло примерно 2 часа. Положительные результаты исследования клинического материала в ДИА полностью (100 %) совпадали с аналогичными результатами, полученными в тест-системах, приготовленных из тех же самых иммунных реагентов *ex tempore*, а также с результатами рутинной реакции биологической нейтрализации токсина на белых мышах, что подтверждает эффективность, сохранение специфической и каталитической активности высушенных препаратов, удлиняет сроки их хранения и улучшает удобство транспортировки в условиях работы санитарно-противоэпидемических бригад в режиме чрезвычайных ситуаций.

Срок хранения леофилизированных препаратов без потери активности – 1 год.

ВЫВОДЫ

Леофильное высушивание иммунологически активных компонентов тест-системы для ДИА на ботулотоксин не ухудшает свойств конечных продуктов, позволяет их более эффективно использовать, особенно при необходимости экспрессного проведения анализа при возникновении биологических угроз.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Загоскина Т.Ю., Балахонов С.В., Чапоргина Е.А., Марков Е.Ю., Гаврилова О.В., Бодрых О.Б., Долгова Т.М., Тайкова Т.С., Иванова Т.А., Попова Ю.О., Корнева А.В. Сравнительная оценка методов детекции ботулотоксина в клиническом материале от больных людей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 4. – С. 65–68.

Zagoskina TY, Balakhonov SV, Chaporgina EA, Markov EY, Gavrilova OV, Bodrykh OB, Dolgova TM, Taikova TS, Ivanova TA, Popova YO, Korneva AV (2014). Comparative evaluation of botulinus toxin detection methods in clinical samples from patients [Sravnitel'naya otsenka metodov detektsii botulotoksina v klinicheskom materiale ot bol'nykh lyudey]. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*, 4, 65-68.

2. Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Носырева Л.И., Бодрых О.Б., Марков Е.Ю., Вейде А.А., Долгова Т.М., Тайкова Т.С., Балахонов С.В. Конструирование тест-системы для скрининга пищевых продуктов и клинического материала на ботулотоксин в дот-

иммуноанализе // Журнал инфекционной патологии. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 20–23.

Zagoskina TY, Subycheva EN, Nosyreva LI, Bodrykh OB, Markov EY, Veide AA, Dolgova TM, Taikova TS, Balakhonov SV (2009). Construction of a test-system for screening

of foodstuffs and clinical samples to botulinus toxin in dot-immunoanalysis [Konstruirovaniye test-sistemy dlya skringinga pishchevykh produktov i klinicheskogo materiala na botulotoksin v dot-immunoanalize]. *Zhurnal infektsionnoy patologii*, 16 (3), 20-23.

Сведения об авторах

Information about the authors

Загоскина Татьяна Юрьевна – доктор медицинских наук, заведующая отделом подготовки и усовершенствования специалистов ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилисера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-39; e-mail: T_Y_Z_@mail.ru)

Zagoskina Tatyana Yurevna – Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Training and Postgraduate Education of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor (664047, Irkutsk, ul. Trilissera, 78; tel.: +7 (3952) 22-01-39; e-mail: T_Y_Z_@mail.ru)

Чапоргина Елена Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Chaporgina Elena Aleksandrovna – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Department of Training and Postgraduate Education of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

Марков Евгений Юрьевич – доктор медицинских наук, заведующий биохимическим отделом ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Markov Evgeny Yurjevich – Doctor of Medical Sciences, Head of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

Попова Юлия Олеговна – лаборант биохимического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Popova Yulia Olegovna – Laboratory Assistant of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

Соловьев Сергей Юрьевич – лаборант-исследователь биохимического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Soloviev Sergey Yurjevich – Research Assistant of the Biochemical Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

Андреевская Нина Михайловна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственного отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Andreevskaya Nina Mikhaylovna – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Research-and-Production Department of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

Балахонов Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Balakhonov Sergey Vladimirovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor