

С.Н. Скопинская¹, С.П. Ярков¹, В.Н. Злобин¹, Х.Х. Валиев²

¹ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения»
Федерального медико-биологического агентства, Москва

² Институт прикладной механики Российской академии наук, Москва

Использование гидрозолей гексацианоферрата железа для создания диагностических иммунохроматографических тест-систем

*На основе синтезированных отрицательно заряженных гидрозолей гексацианоферрата (II) железа (III) (ГЦФЖ) диаметром 10–20 нм получены устойчивые конъюгаты с антителами (Ат) и антигенами (Аг) гликопротеиновой и липополисахаридной природы. Синтезированные гидрозолы ГЦФЖ являются новым типом дисперсной фазы в иммунохроматографическом анализе. Указанные конъюгаты были применены для построения иммунохроматографических тест-систем для выявления холерного экзотоксина, иммуноглобулинов человека, липополисахаридных Аг (ЛПС-Аг) сальмонелл, кроличьих Ат к рекомбинантному гликопротеиновому комплексу из *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv. Сконструированные иммунохроматографические тест-системы обладали высоким быстродействием (5–7 мин), хорошей специфичностью и чувствительностью: по холерному токсину — 2,0 мкг/мл, по ЛПС-Аг сальмонелл — 0,5 мкг/мл.*

Ключевые слова: гидрозолы гексацианоферрата железа, иммунохроматография.

80

В настоящее время иммунохроматографический анализ (ИХА) широко применяется в медицинской диагностике, санитарии, ветеринарии, охране окружающей среды, контроле качества пищевых продуктов [1]. Значительная часть используемых в нашей стране иммунохроматографических тест-систем производится за рубежом, что определяет их достаточно высокую стоимость и относительно низкую доступность для потребителя. В основе метода лежит образование окрашенных или люминесцирующих иммунных комплексов на поверхности пористых мембран с нанесенными иммунокомпонентами. Перемещение и пространственное разделение реагентов происходит за счет действия капиллярных сил. Жидкая проба, содержащая аналит, иммунохимически взаимодействует с особым образом приготовленной дисперсной фазой (конъюгатом), перемещается вдоль аналитической мембраны, на которой в виде полосы иммобилизованы антитела (Ат) или антиген (Аг). В результате образуется «сэндвич» из конъюгата,

аналита и Ат (или Аг), иммобилизованных на мембране. Обнаружение контрольной и аналитической зон происходит визуально, либо с помощью физических измерений коэффициента отражения, контраста, изменения цвета, регистрации люминесценции или магнитной восприимчивости. В качестве дискретной фазы в иммунохроматографии традиционно применяют наночастицы коллоидного золота [2], углерода [3], квантовые точки [4], фосфоры с двухфотонным возбуждением [5], парамагнитные частицы [6], липосомы [7, 8], латексные частицы [9]. Общим требованием к дисперсной фазе является способность образовывать устойчивые гидрозолы, способные связываться с иммунокомпонентами и обладающие яркой окраской, интенсивной люминесценцией или парамагнитными свойствами.

Чувствительность иммунохроматографического анализа наряду с аффинностью применяемых Ат во многом зависит от свойств дисперсной фазы. Несмотря на разнообразие веществ и структур, используемых

S.N. Skopinskaya¹, S.P. Yarkov¹, V.N. Zlobin¹, H.H. Valiev²

¹ Federal state unitary enterprise «State scientific research institute of biological engineering»
Federal medical-biology agency, Moscow

² Institute of applied mechanics Russian academy of science, Moscow

The use of hydrosol hexacyanoferrate (II) ferrum (III) for developing diagnostic lateral flow tests

*On the basis of synthesized negatively charged hydrosol hexacyanoferrate (II) ferrum (III) (HCFF) by diameter 10–20 nm are received stable conjugates with antibodies and antigens glycoprotein and lipopolysaccharide (LPS) nature. Synthesized hydrosol (HCFF) is new type of a disperse phase in the lateral flow assay. Conjugates mentioned above were applied for construction lateral flow tests-systems for revealing cholera toxin, the rabbit antibodies to recombinant glycoproteine complex from *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv, human immunoglobulin, LPS antigens *S. typhimurium*, *S. enteritidis*. Developed lateral flow tests-systems had high analysis speed (5–7 min), good specificity and sensitivity: on cholera toxin of 2,0 ug / ml, on LPS antigens *S. typhimurium*, *S. enteritidis* 0,5 ug / ml.*

Key words: hydrosol hexacyanoferrate (II) ferrum (III), lateral flow assay.

в качестве дисперсной фазы, актуальным является поиск новых соединений, что позволит создавать тест-системы с улучшенными характеристиками, в частности снизит предел обнаружения и время анализа и/или уменьшит его стоимость.

Гидрозоли гексацианоферрата (II) железа (III) (ГЦФЖ) обладают разветвленной поверхностью, способны к адсорбции иммунных компонентов (Ат и Аг различной химической природы), стабильны, обладают яркой окраской. Гидрозоли ГЦФЖ использовали для проведения реакции агглютинации [10], а также в качестве покрытия электродов биосенсоров [11]. Работ, посвященных применению гидрозолей ГЦФЖ для создания иммунохроматографических тест-систем, авторами настоящей статьи обнаружено не было.

Целью данной работы стало получение устойчивых гидрозолей ГЦФЖ, способных к конъюгированию с Ат, Аг липополисахаридной и гликопротеиновой природы, изучение пригодности полученных конъюгатов для конструирования иммунохроматографических тест-систем для выявления холерного экзотоксина (ХТ), Ат к возбудителю туберкулеза, поверхностных Аг сальмонелл и Ат к ним.

Материалы и методы

Реактивы. Использовали сахарозу; хлорное железо (III) 6-водное; бычий сывороточный альбумин (БСА), фракция V (Sigma, США); твин 20 (Fluka). Остальные реактивы были отечественного производства с чистотой ЧДА (чистый для анализа) или ХЧ (химически чистый).

Иммунные компоненты. Использовали кроличью анти-сыворотку, содержащую поликлональные Ат к иммуноглобулинам (Ig, G+A+M) человека (КрАЧ), кроличью анти-сыворотку к ХТ, липополисахариды (ЛПС) из *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* серотип INABA 569В, *Escherichia coli* 0128:B12. Все препараты «Sigma» (США). Липополисахариды из *Shigella sonnei* (хроматографически очищенный препарат) получены от В.Л. Львова (ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России). Применяли козьи антикроличьи IgG (Коз-АКр) и IgG человека (оба препарата — ООО «ИМТЕК», Россия). Рекомбинантный гликопротеиновый комплекс из *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv (ТБ), а также кроличьи Ат к нему (КрАТБ) были любезно предоставлены Н.Н. Кисличкиным и О.А. Ивановой (ООО «Бионом», Россия). Использовали сыворотки диагностические сальмонеллезные неадсорбированные сухие к *S. typhimurium* и *S. paratyphi* В для реакций агглютинации и пассивной гемагглютинации (РПГА) (Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству вакцин, Россия). В качестве источника холерного экзотоксина применили лиофильно высушенный препарат холерной вакцины (ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов; ФС 42-3676-98).

Получение препаратов гидрозоля. Гидрозольные препараты ГЦФЖ (тривиальные названия: «Берлинская лазурь», «Прусский голубой») синтезировали при смешивании 3 мл 0,005 N раствора $K_4[Fe(CN)_6]$ и 1 мл 0,005 N раствора $FeCl_3$. Спустя 2 мин инкубации при комнатной температуре вносили 10–20 мл воды [12]. Для определения знака заряда гидрозоля каплю препарата капали на фильтровальную бумагу. Оценку знака заряда (+ или -) проводили визуально по виду пятна синего цвета. Знак заряда коллоидных частиц в окрашенных золях определяли методом капиллярного анализа. Метод основан

на том, что целлюлозные стенки капилляров фильтровальной бумаги заряжаются отрицательно, а пропитывающая бумагу вода — положительно. Если на листок бумаги нанести каплю исследуемого золя, то частицы, заряженные положительно, адсорбируются на стенках капилляров, поэтому золь с положительными частицами дает окрашенное в центре и бесцветное по краям пятно. Золь с отрицательно заряженными частицами, не адсорбирующимися на стенках капилляров, образует равномерно окрашенное пятно [13].

Для получения конъюгатов Аг или Ат с частицами гидрозоля ГЦФЖ к препарату добавляли водный раствор, содержащий иммунный компонент, смесь инкубировали на магнитной мешалке в течение 30 мин при комнатной температуре и добавляли БСА до конечной концентрации 0,1%. Через 2 мин инкубации при тех же условиях смесь центрифугировали при 50000–60000g на ультрацентрифуге «L8-70M» (Beckman, США) с помощью ротора SW 50,1–50,000 RPM (Beckman, США). Осадок суспендировали в 0,1% растворе БСА. Суспензию повторно центрифугировали в тех же условиях. Осадок суспендировали в 0,1% растворе БСА. Определяли длину волны поглощения в максимуме и его величину. С помощью состава 10% сахарозы и 0,25% БСА в виде раствора готовили суспензии гидрозоля с определенной оптической плотностью (ОП) и наносили на подложку для конъюгата с последующим высушиванием при температуре 20–24°C и постоянной влажности.

Величину поглощения и длину волны в максимуме поглощения гидрозоля регистрировали на спектрофотометре «Genesys™ 10 UV» в диапазоне длин волн 640–740 нм, (Thermotronic, США). Препарат гидрозоля хранили в темноте при комнатной температуре или в холодильнике при 4–8°C.

Материалы для иммунохроматографии. Для создания иммунохроматографического мультимембранного композита применили нитроцеллюлозные мембраны HF120 форматом 60–300 мм, адсорбционные подложки CFSP203000 и подложки для нанесения образца из целлюлозной бумаги CFSP173000, подложки для конъюгата GFSP001000 (Millipore, США), пластиковые оправки для иммунохроматографических тестов (Advanced Micro Devices, Индия) с размерами 20–70 мм. Оправка включала отверстия для внесения образца и считывания результатов анализа.

Методы формирования мультимембранного композита и используемое для этого оборудование описаны в работе [14]. Размеры тест-полоски — 5–59 мм. Ширина полос, наносимых в аналитическую и контрольную зоны иммунокомпонентов, не превышала 0,5 мм. Расстояние между контрольной и аналитической зонами было равно 6 мм. Иммунохроматографию проводили при температуре 20–24°C. Учет результатов ИХА проводили визуально. Для получения количественных данных интенсивность окрашивания линий иммунохроматограмм измеряли с помощью анализатора иммунохроматографического видеопроцессора «АИВЦ-1» (разработка ФГУП «ГосНИИБП» ФМБА России).

Для постановки реакции иммунохроматографии в отверстие для нанесения образца вносили 120 мкл раствора, содержащего рабочий раствор или исследуемый образец в том же растворе.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Для определения размеров и геометрии частиц гидрозоля ГЦФЖ применяли метод АСМ. Атомно-силовой микроскоп «easyScan» (Nanosurf, Швейцария) работал в контактном режиме на воздухе при комнатной температуре. В каче-

Таблица. Состав и чувствительность иммунохроматографических тестов на основе гидрозолей ГЦФЖ

Аналит	Состав иммунохроматографического теста				Предел обнаружения аналита (мкг/мл), либо значения титра Ат
	Обозначение тест-системы	Состав конъюгата ГЦФЖ и нагрузка иммунного компонента в мкг/мл гидрозоля	Состав и концентрация иммунного компонента в аналитической зоне (мг/мл)	Состав и концентрация иммунного компонента в контрольной зоне (мг/мл)	
Холерный экзотоксин	I	Антихолерогенная сыворотка (400,0)	Антихолерогенная сыворотка (6,5–9,0)	Коз-АКр (2,0)	2,0
КрАТБ	II	ТБ (0,5–2,0)	ТБ (0,15–0,5)	КрАТБ (2,5)	12,5
IgG человека	III	КрАЧ (400)	КрАЧ (8–10)	Коз-АКр (2,5)	0,5
АТ к <i>S. typhimurium</i> (серогруппа В)	IV	ЛПС <i>S. typhimurium</i> (0,2)	ЛПС <i>S. typhimurium</i> (2,0)	Антисыворотка к <i>S. typhimurium</i> или <i>S. paratyphi B</i> (8,0–10,0)	1:5120
ЛПС <i>S. typhimurium</i> (серогруппа В)	IV*	ЛПС <i>S. typhimurium</i> (0,2)	ЛПС <i>S. typhimurium</i> (2,0)		0,5
ЛПС <i>S. enteritidis</i> (серогруппа D)					0,5

Примечание. * — анализ проводился с предварительной инкубацией аналита с фиксированным количеством антисыворотки.

стве подложки для нанесения ГЦФЖ использовали высокоориентированный пиролитический графит «ВОПГ» (ZYH GRHS/1,2) производства фирмы «NTM-DT» (Зеленоград, Россия). Атомно-гладкий ВОПГ позволял исключить искажения от неровностей подложки и удерживал наночастицы ГЦФЖ на своей поверхности. Каплю гидрозоля ГЦФЖ наносили на подготовленную поверхность ВОПГ, высушивали на воздухе при комнатной температуре до полного удаления растворителя и затем исследовали методом АСМ.

Результаты и обсуждение

Полученный препарат гидрозоля ГЦФЖ имел интенсивный синий цвет. Поверхность частиц была заряжена отрицательно. Гидрозоли сохраняли свою агрегативную устойчивость в течение 12 мес (срок наблюдения) хранения в темноте при комнатной температуре или в холодильнике при +4...+8°C. Препараты имели ОП=1,0–3,0 ед. в максимуме поглощения суспензии гидрозоля при 698–704 нм.

Изображение частиц гидрозоля ГЦФЖ на поверхности ВОПГ, полученное с помощью АСМ, показывает наличие как отдельных частиц ГЦФЖ, так и их агрегатов. Гидрозоль ГЦФЖ представляет собой частицы округлой формы с диаметром в диапазоне 10–20 нм.

Получены конъюгаты гидрозолей ГЦФЖ с молекулами липополисахаридной (ЛПС сальмонелл), белковой (КрАЧ, антихолерогенная сыворотка) или гликопротеиновой (ТБ) природы. Анализ спектральных характеристик показал, что сенсбилизация частиц сопровождается сдвигом максимума поглощения препарата на ≈7–12 нм в длинноволновую область.

В тест-системе (I) для выявления ХТ использовали конъюгат иммуноглобулинов антихолерогенной сыворотки с гидрозолем ГЦФЖ, эти же иммуноглобулины были нанесены в аналитическую зону мембраны. В качестве антивидовых Ат контрольной зоны применили Коз-АКр. В процессе ИХА холерный экзотоксин иммунохимически взаимодействует с Ат конъюгата, а образовавшийся комплекс мигрирует под действием капиллярных сил, взаимодействуя с Ат аналитической зоны. В результате в аналитической зоне появляется окрашенная в синий цвет полоса. Избыток конъюгата, не связавшийся в аналитической зоне, мигрирует к контрольной зоне, где взаимодействует с антивидовыми Ат, образуя окрашенный комплекс.

Аналогичным образом происходит ИХА для выявления кроличьих Ат к ТБ (тест-система II), IgG человека (тест-система III), Ат к ЛПС *S. typhimurium* (IV). В этих случаях используется свойство Ат связываться одной валентностью с Аг конъюгата, а второй валентностью — с Аг, нанесенным в аналитическую зону.

Для всех разработанных тест-систем было показано, что введение в отверстие для нанесения образца рабочего раствора приводит к появлению интенсивной полосы синего цвета в контрольной зоне и ее отсутствию в зоне аналитической полосы, что говорит об отсутствии неспецифического взаимодействия конъюгатов частиц гидрозоля ГЦФЖ с компонентом, нанесенным в аналитическую зону. Частицы конъюгата гидрозоля ГЦФЖ проходили через нитроцеллюлозную мембрану ровным фронтом сине-голубого цвета, практически не давая «подтеков» и «наплывов». Фон мембраны был белым или светло-голубым, и несколько темнел при длительном хранении мембран. За пороговые значения принимали показания прибора «АИВЦ-1», равные 1,0 усл. ед., соответствующие появлению видимой глазом полосы. Состав конъюгатов гидрозолей ГЦФЖ, которые были использованы для построения тест-систем, указан в таблице. Схема построения тест-систем приведена на рис. 1.

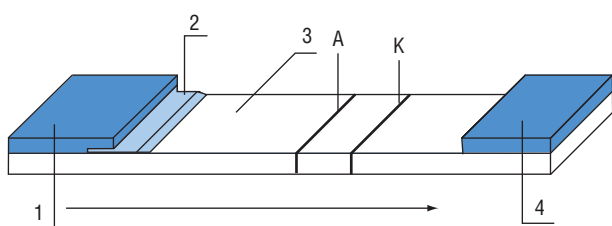


Рис. 1. Схема построения тест-систем для проведения ИХА

Примечание. 1 — подложка для впитывания аналита, 2 — подложка для конъюгата ГЦФЖ с иммунокомпонентами, 3 — аналитическая мембрана, 4 — подложка для впитывания избытка жидкости, А — аналитическая зона с нанесенными иммунокомпонентами, К — контрольная зона с нанесенными иммунокомпонентами. Стрелкой указано направление тока жидкости.

Введение в тест-систему исследуемого образца, содержащего ХТ (тест-система I), КрАТБ (тест-система II), IgG человека (тест-система III) или Ат к ЛПС *S. typhimurium* (тест-система IV), сопровождалось появлением на мембране двух полос синего цвета: в аналитической и контрольной зонах. Интенсивность окраски полосы аналитической зоны повышалась во времени и с концентрацией аналита в пробе.

Для оценки аналитических возможностей разработанных тест-систем было изучено влияние на чувствительность системы таких параметров, как оптическая плотность суспензии конъюгата, концентрация препарата, наносимого в область аналитической и контрольной зон, сенсibiliзирующая концентрация Ag или Ат, состав рабочего раствора и время реакции. Оптимальным оказалось применение конъюгатов с ОП=2,5–3,0 ед. В качестве рабочего раствора использовали 1% твин 20.

Были получены конъюгаты гидрозоля ГЦФЖ с антихолерогенной сывороткой с нагрузкой 100, 200, 400 или 500 мкг/мл по белку. Предел обнаружения ХТ составил 25 и 10 мкг/мл при использовании сыворотки с концентрацией 100 или 200 мкг/мл, соответственно, и 2 мкг/мл в опытах при использовании для формирования конъюгатов сыворотки с концентрацией 400 или 500 мкг/мл.

Аналогичным образом был оптимизирован состав тест-систем для обнаружения КрАТБ и IgG человека. Были получены конъюгаты гидрозоля ГЦФЖ с препаратом ТБ с нагрузкой 0,1; 0,5 или 2,0 мкг/мл по белку, а также конъюгаты гидрозоля с КраЧ с нагрузкой 200 или 400 мкг/мл. Интенсивность сигнала в аналитической зоне тест-системы (II) была выше при использовании конъюгатов с ТБ в концентрации 0,5 или 2,0 мкг/мл. Для обнаружения IgG человека оптимальным было использование тест-системы (III) с КраЧ с нагрузкой 400 мкг/мл.

Для тест-системы (IV), предназначенной для определения ЛПС-Аг сальмонелл и специфических Ат, были получены препараты гидрозоля, сенсibiliзированные ЛПС *S. typhimurium* в концентрации 0,05; 0,2; 1,0; 20,0 и 100,0 мкг/мл. Титры сальмонеллезной сыворотки, зарегистрированные с использованием полученных тест-систем, составили, соответственно, 1:5120, 1:5120, 1:2560, 1:1280 и 1:640.

Были определены концентрации препаратов, наносимых в аналитическую и контрольную зоны, обеспечивающие максимальную интенсивность сигналов. В таблице приведены данные по составу тест-систем на основе гидрозолей ГЦФЖ, отражающие их оптимальные возможности для выявления различных Ag и Ат.

Следует отметить высокую скорость перемещения частиц гидрозоля ГЦФЖ по нитроцеллюлозной мембране и формирования окраски аналитической и контрольной зон, что отличает ИХА с использованием гидрозолей ГЦФЖ от анализа на основе золя золота. При высоких концентрациях аналита видимый глазом сигнал появлялся через 1–2 мин после введения образца, сразу после прохождения фронта суспензии конъюгата через зону аналитической полосы.

В опытах с гидрозольем ГЦФЖ величина сигнала в аналитической зоне спустя 2 мин после внесения образца, содержащего ХТ, составила 70% максимального ответа, зарегистрированного через 5–10 мин. При использовании золя золота ответ через 10 мин составил только 45% максимального, выявленного спустя 45 мин (рис. 2).

Предел обнаружения ХТ соответствовал 2,0 мкг/мл белка холерной вакцины, что ниже, чем при использовании в качестве носителей в ИХА наночастиц золота, флуоресцирующих латексов (0,5–1,0 мкг/мл) или сенсibiliзированных

ванных моносиало GM₁ липосом с инкапсулированным сульфородаминоом 101 (100 нг/мл) [8]. Однако применение гидрозолей ГЦФЖ в ИХА позволяет снизить время анализа. Например, при использовании липосом время анализа ХТ составило 30–40 мин [8], а при использовании гидрозолей ГЦФЖ — всего 5–7. Специфичность ИХА подтверждается тем, что внесение в реакционную смесь вместо холерного экзотоксина препаратов ботулинического, дифтерийного или столбнячного анатоксинов в концентрации 100 мкг/мл не приводило к появлению в области аналитической зоны заметной глазом полосы синего-голубого цвета. В тех же условиях интенсивность сигнала в присутствии препарата холерной вакцины составила 3,6–15,0 усл. ед.

На рис. 3 представлена кривая титрования сыворотки к *S. typhimurium*, полученная с применением гидрозолей препаратов ГЦФЖ, сенсibiliзированных ЛПС *S. typhimurium* (тест-система IV). Видно, что кривая имеет колоколообразный вид с нарастанием интенсивности ответа при увеличении содержания в пробе специфических Ат и максимальным ответом при определенных концентрациях сальмонеллезных Ат. Дальнейшее повышение уровня Ат приводило к снижению сигнала, то есть наблюдался так называемый «эффект сползания» (hook effect). Подобные закономерности наблюдаются при проведении многих иммунохимических реакций, например при титровании сывороток методом комплемент-зависимого липосомного иммуноанализа или твердофазного иммуноферментного анализа.

Аналогичные кривые получены при титровании Ат к туберкулезному комплексу из *M. tuberculosis* (КрАТБ) и IgG человека с использованием тест-систем II и III (данные не представлены). Специфичность анализа доказывается тем, что введение в тест-систему III для выявления IgG человека мышинных Ат или в тест-систему II для обнаружения кроличьих Ат к ТБ кроличьих, антимышинных Ат в концентрации 250 мкг/мл не привело к появлению в области аналитической зоны видимой глазом полосы синего-голубого цвета.

Иначе построен ИХА для выявления ЛПС-Аг сальмонелл. Для обнаружения ЛПС применили подход, при

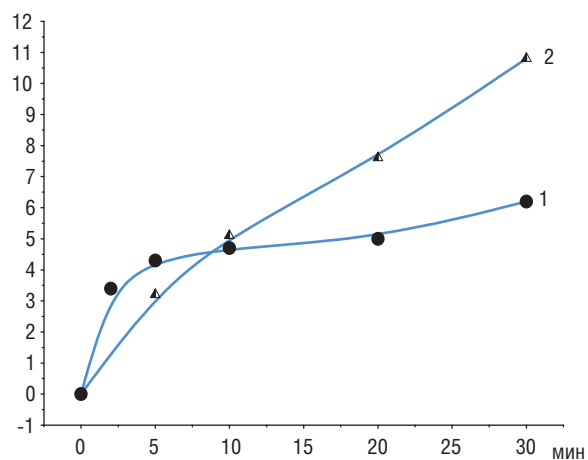


Рис. 2. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны мембраны от времени реакции

Примечание. По оси абсцисс — время анализа (мин); по оси ординат — значение интенсивности окраски в аналитической зоне (усл. ед.), зарегистрированные с помощью прибора «АИВЦ-1». Использовали конъюгаты гидрозоля ГЦФЖ (1) или золя золота (2) с антихолерогенной сывороткой. Образец содержал препарат холерной вакцины в концентрации 25 мкг/мл (1) или 10 мкг/мл (2) по белку.

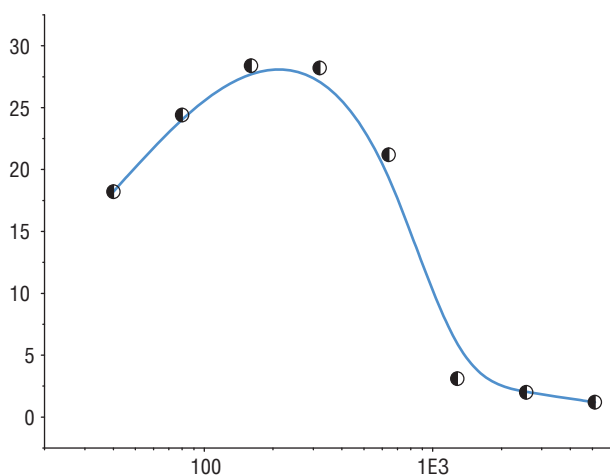


Рис. 3. Зависимость интенсивности сигнала в аналитической зоне мембран от разведения сыворотки к *S. typhimurium*

Примечание. По оси абсцисс — разведение сыворотки; по оси ординат — значение интенсивности окраски в аналитической зоне (усл. ед.), зарегистрированные с помощью АИВЦ-1. Время анализа 5 мин.

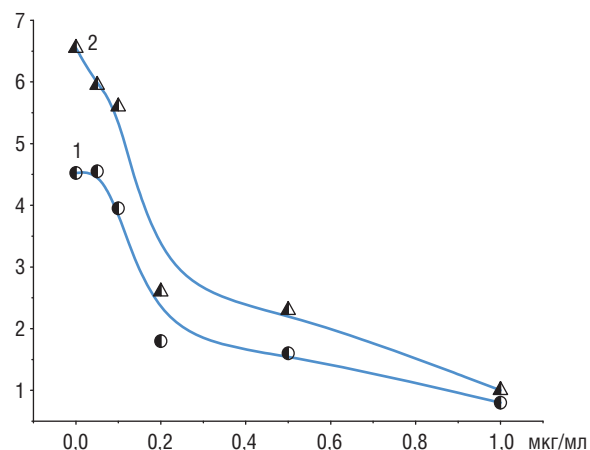


Рис. 4. Зависимость интенсивности сигнала в аналитической зоне мембран от концентрации ЛПС *S. typhimurium* в исследуемом образце

Примечание. По оси абсцисс — концентрация ЛПС в образце (мкг/мл); по оси ординат — значение интенсивности окраски в аналитической зоне (усл. ед.), зарегистрированные с помощью АИВЦ-1. Использовали сыворотку к *S. typhimurium* в разведении 1:350. Результаты регистрировали через 5 (1) или 10 (2) мин после внесения пробы.

котором сальмонеллезную сыворотку предварительно смешивали с раствором ЛПС, что приводило к связыванию ЛПС Ат сыворотки. В дальнейшем использовали тест-систему IV, где в иммунохимической реакции с конъюгатом участвовала оставшаяся часть свободных Ат, количество которых было тем больше, чем меньше ЛПС-Аг. Использовали такое разведение сыворотки, которое при ее титровании обеспечивает в аналитической зоне сигнал, менее интенсивный, чем максимальный. Смесь перемешивали, инкубировали при комнатной температуре 10 мин и наносили на подложку для образца. В контрольной пробе (не содержит раствор ЛПС) в аналитической зоне появлялась полоса сине-голубого цвета. В пробах, содержащих ЛПС, в зависимости от концентрации аналита полоса в области аналитической зоны имела менее интенсивную окраску или отсутствовала полностью.

Было установлено, что наличие в пробе 0,1–0,5 мкг/мл ЛПС *S. typhimurium* приводило к появлению в аналитической зоне полосы, интенсивность которой ниже наблюдаемой в контрольных пробах. Растворы ЛПС с концентрацией ≥ 1 мкг/мл полностью ингибировали иммунохимическую реакцию (рис. 4). Как и в других иммунохимических реакциях, использование для постановки реакции сыворотки с меньшим содержанием Ат повышало чувствительность анализа. В специальных опытах нами показано, что матрикс сыворотки крови человека не препятствует выявлению ЛПС *S. typhimurium* с использованием разработанной тест-системы.

Оказалось, что с помощью данной тест-системы можно обнаруживать ЛПС *S. enteritidis* (группа D) почти с такой же чувствительностью, что и ЛПС *S. typhimurium* (группа B) (см. табл.). Это может быть связано с тем, что ЛПС *S. enteritidis* и *S. typhimurium* обладают общими рецепторами 1 и 12 [15].

ЛПС из *S. typhi* (ЛПС *S. typhimurium* и *S. typhi* обладают одним общим рецептором 12) в данной тест-системе не работал. Специфичность разработанной тест-системы доказывает, что ЛПС *V. cholerae* серотип INABA 569B, *E. coli* 0128:B12 и *S. sonnei* в концентрациях до 20 мкг/мл не давали ложноположительных результатов.

Полученные нами экспериментальные данные показали принципиальную возможность применения гидрозолей ГЦФЖ для создания чувствительного и специфичного ИХА токсинов, Аг микроорганизмов и специфических Ат, в частности к возбудителям таких социально-значимых болезней, как туберкулез и сальмонеллез. Результаты ИХА могут наблюдаться визуально (четкие полосы сине-голубого цвета на фоне белых нитроцеллюлозных мембран), либо регистрироваться рефлектометрически, что позволяет снизить предел обнаружения аналита и повысить объективность анализа. ИХА может проводиться в лабораториях различной степени оснащения, а также во внелабораторных условиях. Очевидно, что гидрозоли ГЦФЖ не только пригодны для использования в ИХА, но и придают ему новые полезные качества. В частности, существенно сокращается время анализа: результат о наличии в образце сыворотки крови антител к возбудителю сальмонеллеза можно получить спустя 5–10 мин. С помощью используемой в практике РПГА аналогичный ответ получают через 2,0–2,5 ч инкубации в термостате при 37°C, при этом постановка реакции носит более сложный характер. Методы на основе ИХА для выявления Аг и сальмонеллезных Ат отсутствуют. Особое значение в ранней диагностике имеет обнаружение циркулирующих Аг, так как динамика их появления, как правило, опережает динамику формирования специфических Ат. Основным методом лабораторной диагностики сальмонеллеза остается бактериологический метод, проведение которого занимает несколько суток. Кроме того, эффективность бактериологического анализа остается низкой, так как зависит от сроков обследования, предшествующей антибактериальной терапии, инфект-дозы возбудителя и качества диагностических сред. Полученные в работе данные свидетельствуют о перспективности ИХА с использованием гидрозолей ГЦФЖ для диагностики сальмонеллеза. Тест-системы на основе гидрозолей ГЦФЖ сохраняют свои иммунохимические свойства в течение 8 месяцев (срок наблюдения) хранения при комнатной температуре в запаянных пакетах с осушителем.

REFERENCES

1. Lateral flow immunoassay / Ed. R.C. Wong, H.Y. Tse. N.-Y.: Humana Press a part of Springer. *Science&Business Media*. 2009. 430 p.
2. Chandler J., Gurmin T., Robinson N. The place of gold in rapid tests. *IVD Technology*. 2000; 6: 37–49.
3. Van Amerongen A., Wiechers J.H., Brendsen L.B. Colloid carbon particles of a new label for rapid immunochemical test methods: quantitative computer image analyses of results. *J. Biotechnol.* 1993; 30 (2): 185–195.
4. Chan W.C.W., Nie S. Quantum dots: a primer. *Appl. Spectroscopy*. 2002; 56: 16A.
5. Niedbala R., Feindt H., Kardos K. Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphors technology. *Anal. Biochem.* 2001; 293: 22–30.
6. La Borde R.T., O' Farrell B. Paramagnetic particles detection in lateral flow assays. *IVD Technology*. 2002; April issue: 36.
7. Ahn-Yoon S., DeCory T.R., Baeumner A.J., Durst R.A. Ganglioside-liposome immunoassay for the ultrasensitive detection of cholera toxin. *Anal. Chem.* 2003; 75: 2256–2261.
8. Iarkov S.P., Skopinskaia S.N., Shilenko I.V., Zlobin V.N. Liuminescentny'i immunokhromatograficheski analiz antigenov miqroorganizmov. *Vestn. RAMN.* 2009; 3: 20–26.
9. Iarkov S.P., Shilenko I.V. Primenenie immunokhromatografii dlia vy'iaveniia patogenov i diagnostiki zabolevanii'. V kn.: *Sovremenny'e metody' indikatsii patogenov i toksinov v ob`ektakh okruzhaiushchei' srede' i diagnostiki sotcial'no-znachimy'kh infekcionny'kh zabolevanii' dlia obespecheniia himicheskoi' i biologicheskoi' bezopasnosti /pod red. V.N. Zlobina. Moskva. 2010. S. 57–118.*
10. Orlova O.Iu., Meshandin A.G. Sopostavlenie razlichny'kh vidov tverd'kh faz pri sinteze gidrozol'ny'kh immunohimicheskikh diagnostikumov. *Viatskii' medicinskii' vestneyq.* 2002; 3 (12): 61–65.
11. Ling S. Study on immunosensor based on gold nanoparticles / chitosan and MnO₂ nanoparticles composite membrane / Prussian blue modified gold electrode. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2009; 32 (3): 407–414.
12. Sergeeva N.G., Iushkova I.K. Laboratorny'i praktikum po kolloidnoi' himii. *Nizhnii' Tagil.* 2005. 50 s.
13. Pis'menko V.T., Kaliukova E.N. Kolloidnaia himiia: Metodicheskie uqazaniia. *Ul'ianovsq: UIGTU.* 2003. 72
14. Iarkov S.P., Tret'iakov S.I., Basharova L.A., Zlobin V.N. Indikatsiia vzbuditelei' osobo opasny'kh zabolevanii' s pomoshch'iu immunokhromatografii i videotcifrovogo analiza. *Vestn. RAMN.* 2007; 12: 22–26.
15. Vorob'ev A.A. Mikrobiologiya i immunologiya. *M.: Meditsina.* 1999. 464 c.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Скопинская Светлана Николаевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГУП Государственного научно-исследовательского института биологического приборостроения Федерального медико-биологического агентства России

Адрес: 125424, Москва, Волоколамское шоссе, д. 75, к. 1

Тел./факс: (495) 491- 73-72

E-mail: niibp@dol.ru

Ярков Сергей Петрович, доктор биологических наук, начальник отдела спектральных методов анализа ФГУП Государственного научно-исследовательского института биологического приборостроения Федерального медико-биологического агентства России

Адрес: 125424, Москва, Волоколамское шоссе, д. 75, к. 1

Тел./факс: (495) 491- 73-72

E-mail: niibp@dol.ru

Злобин Владимир Николаевич, доктор технических наук, профессор, директор ФГУП Государственного научно-исследовательского института биологического приборостроения Федерального медико-биологического агентства России

Адрес: 125424, Москва, Волоколамское шоссе, д. 75, к. 1

Тел./факс: (495) 491- 73-72

E-mail: niibp@dol.ru

Валиев Хаммат Хафизович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Отдела механики структурированных и гетерогенных сред ФГБУ науки Института прикладной механики Российской академии наук

Адрес: 125040, Москва, Ленинградский проспект, д. 7

Тел.: (495) 946-17-64

E-mail: hhvlv@mail.ru