

РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВИРУСА ДЕНГЕ

© 2018 г. Е. К. Шаулина*, И. В. Шиленко, С. П. Ярков,
Е. Н. Храмов

*E-mail: Eshaulina@gmail.com

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического
приборостроения» ФМБА России, Москва, Россия

Разработан иммунохроматографический тест (ИХТ) на основе конъюгатов поликлональных мышинных антител и наночастиц коллоидного золота (НКЗ) для выявления антигенов вирусов денге (ВД) I–IV серотипов. Чувствительность при визуальной регистрации составила 5×10^4 БОЕ/мл (типы вируса I–III), 5×10^3 БОЕ/мл (тип вируса IV). Для повышения чувствительности применен прием усиления контраста аналитической и контрольной зон теста наночастицами серебра, который обеспечил 10-кратное увеличение чувствительности по сравнению с тестом на основе НКЗ визуально, и приборную чувствительность 200 БОЕ/мл (типы вируса I–III). ИХТ может быть использован для выявления антигенов ВД в биологических жидкостях человека с целью диагностики заболевания на ранних стадиях, а также для выявления ВД в насекомых-переносчиках.

Ключевые слова: антигены, вирус денге, иммунохроматография, усиление серебром

DOI: 10.31857/S102872210002680-3

Адрес: 125424 Москва, Волоколамское шоссе, д. 75 корпус 1.
ФГУП «ГосНИИБП», Шаулина Екатерина Константиновна.
Тел. 8(985)2378736, E-mail: Eshaulina@gmail.com.

Авторы:

Шаулина Е. К., м. н. с. ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения», Москва, Россия;

Шиленко И. В., в. н. с., к. т. н. ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения», Москва, Россия;

Ярков С. П., начальник отдела, д. б. н. ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения», Москва, Россия;

Храмов Е. Н., директор института, д. т. н., профессор ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения», Москва, Россия.

Введение. Лихорадка денге (ЛД) относится к группе арбовирусных инфекций, передающихся животным и человеку через укусы кровососущих насекомых, проявляется как острое трансмиссивное вирусное заболевание [1]. Завозные случаи инфицирования людей в Российской Федерации исчисляются десятками в год. Быстрая и точная диагностика лихорадки денге значительно снижает риск осложнений. В период от 3–9 дней после укуса комара-переносчика вирионы, неструктурный белок вируса NS1, другие антигены вируса денге (ВД) вызывают активацию воспалительных цитокинов и могут быть выявлены в клеточных культурах, в крови

и сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа, иммуноблота или иммунохроматографии [2]. ИХТ для выявления антигенов ВД, позволяют проводить одностадийный анализ за 15 мин со специфичностью 90–100%, диагностической чувствительностью 45–80% в объеме 150 мкл сыворотки, плазмы или цельной крови пациентов [3, 4].

Целью работы было создание ИХТ для выявления антигенов ВД, в котором для повышения аналитической чувствительности выявления, по сравнению с традиционными ИХТ, применен прием усиления серебром (silver enhancement), ранее описанный в литературе для выявления вирусов растений [5, 6].

Материалы и методы. Для построения ИХТ применяли иммуноглобулин IgG поли-денге, выделенный из асцитной иммунной жидкости мышей на протеин А-сефарозе против 4-х серотипов ВД. В качестве иммуногенов использовали смесь антигенов ВД различных серотипов: тип I – Hawaii, тип II – Ngc, тип III – H-87, тип IV – H-24. Антигены были приготовлены методом сахарозо-ацетоновой экстракции из мозга белых мышей, инфицированных ВД. Паспортизованные антитела и антигены ВД получены из лаборатории арбовирусов ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Для усиления чувствительности ИХТ применяли нитрат серебра (ч) и гидрохинон (хч), Россия. Проявляющую смесь готовили, смешивая равные объемы 0,3% водного раствора AgNO_3 с 3% гидрохиноном, приготовленном на 0,5 М цитратном буфере pH 4,0. Конструкция ИХТ, получение наночастиц коллоидного золота (НКЗ), конъюгатов с антителами, состав буфера для проведения анализа были подробно описаны нами ранее [7].

Иммунохроматографию смеси антигенов ВД проводили следующим образом: 140 мкл исследуемой пробы помещали в лунку планшета для проведения иммуноферментного анализа, затем опускали в нее ИХТ впитывающей подложкой вниз. Регистрировали результат по появлению окрашенных в вишневый цвет полос на аналитической мембране визуальное спустя 25 мин. Определяли интенсивность окрашивания аналитической зоны ИХТ на анализаторе иммунохроматограмм «Рефлеком» (НТЦ «Компонент», Россия). Усиливали интенсивность и контраст аналитической и контрольной зоны теста путем добавления проявляющей смеси, содержащей нитрат серебра и гидрохинон. Для этого аналитическую мембрану с аналитической и контрольной зонами отсоединяли от других подложек, три раза промывали струей деионизованной воды. Остатки воды удаляли фильтровальной бумагой, затем мембрану располагали на горизонтальной поверхности, и увлажняли 40 мкл проявляющей смеси. Через 5 мин проявляющую смесь удаляли фильтровальной бумагой и наносили 20 мкл 25% водного раствора тиосульфата натрия. Через 5 мин избыток раствора тиосульфата натрия удаляли фильтровальной бумагой, результат оценивали визуальное и с помощью видеоцифрового анализатора. Все инкубации на стадии усиления проводили в темноте, прикрывая аналитическую мембрану светонепроницаемой крышкой.

Результаты и обсуждение. При проведении иммунохроматографии вирусные антигены ВД связываются с антителами конъюгата НКЗ и током элюирующего буфера переносятся по аналитической мембране к аналитической и контрольной зонам ИХТ. В аналитической зоне, в силу специфического иммунного взаимодействия, образуется окрашенный НКЗ «сэндвич», состоящий из конъюгата, антигенов ВД и адсорбированных на мембране антител к ним. Избыток конъюгата, в контрольной зоне теста образует иммунный комплекс с козьими антимышиными антите-

лами, также образуя окрашенную зону. Стадия усиления серебром заключается в образовании оболочки атомов серебра вокруг НКЗ в аналитической и контрольной зонах теста. НКЗ являются центрами конденсации атомов серебра, которые образуются при восстановлении нитрата серебра гидрохиноном в условиях контролируемого pH. Вишневый цвет аналитической и контрольной зон теста изменяется на темный, указывающий на осаждение металлического серебра. Из-за увеличения контраста между линиями иммунохроматограммы и мембраной чувствительность визуального выявления антигенов ВД увеличилась в 10 раз, т.е. после стадии усиления серебром достоверно выявляются концентрации антигенов ВД соответствующие 5×10^3 БОЕ/мл (типы I–III), 5×10^2 БОЕ/мл (тип IV). Приборная чувствительность выявления антигенов ВД после стадии обычной иммунохроматографии составила 5×10^3 БОЕ/мл, а после стадии усиления серебром возросла в 25 раз и составила 200 БОЕ/мл (типы вируса I–III).

Описанный в настоящей работе прием усиления чувствительности выявления антигенов ВД с помощью солей серебра может быть применен не только при анализе биологических жидкостей человека, но и при анализе образцов, взятых из внешней среды, например при отлове кровососущих насекомых, с целью выявления переносчиков вирусной инфекции.

Работа была выполнена в рамках государственного контракта ГК 42.147.8.0 с ФМБА России. Авторы работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. WHO. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control/ WHO// Geneva – 1997.
2. *Peeling R. W., Artsob H., Pelegrino J. L.* Evaluation of diagnostic tests: dengue Rev Microbiol. 2010, 8, 30–38.
3. *Andries A. C., Duong V, Ngan C.* Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. PLoS Negl. Trop. Dis.–2013, 7, 2116.
4. *Chaterji S., Allen J. C., Chow A.* Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2011, 84, 224–228.
5. *Panferov V. G., Safenkova I. V., Varitsev Y. A.* Development of the sensitive lateral flow immunoassay with silver enhancement for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers. Talanta. 2016, 152, 521–530.
6. *Drygin Yu. F., Blintsov A. N., Osipov A. P.* High_Sensitivity Express Immunochromatographic Method for

Detection of Plant Infection by Tobacco Mosaic Virus. *Biokhimiya*. 2009, V. 7(9), 1212–1220.

7. *Титов А. А., Ярков С. П., Шиленко И. В.* Разработка и оптимизация иммунохроматографических тестов для выявления ботулинических токсинов.

Прикладная биохимия и микробиология. 2012, 48(2), 1–8. [*Titov A. A., Yarkov S. P., Shilenko Y. V.* Development and optimization of immunochromatographic tests for detection of botulinum toxins. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012, 48(2), 1–8.

DEVELOPMENT OF A HIGHLY SENSITIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR THE DETECTION OF ANTIGENS OF THE DENGUE VIRUS

© 2018 **E. K. Shaulina***, **I. V. Shilenko**, **S. P. Yarkov**,
E. N. Khramov

*E-mail: Eshaulina@gmail.com

Federal State Unitary Enterprise “State Scientific-Research Institute of Biological Engineering”, Moscow, Russia

An immunochromatographic test (ICT) was developed based on colloidal gold nanoparticles (GNP) and polyclonal mouse antibodies against dengue virus (DV) I–IV serotypes. Sensitivity of the ICT in the case of visual registration was 5×10^4 PFU/ml (virus types I–III), 5×10^3 PFU/ml (type IV). To increase the sensitivity, a method is used to enhance the contrast of the analytical and control zones of the ICT with silver nanoparticles. Silver enhancement with visual registration gives a 10-fold increase in sensitivity in comparison with the test based on GNP, and in case of instrumental detection, ICT sensitivity increase up to 200 PFU/ml (types of virus I–III). The developed ICT can be used to detect antigens of DV in human biological fluids in order to diagnose the disease in the early stages, as well as to detect DV in insect vectors.

Key words: antigens, dengue virus, immunochromatography, silver enhancement

Autors:

Shaulina E. K., ✉ Junior researcher of FSUE «State Research Institute of Biological Instrumentation», Moscow, Russia; 125424 Moscow, Volokolamskoe highway, 75 Building 1, FSUE «SSRIBE». Phone 8 (985) 2378736; **E-mail:** Eshaulina@gmail.com;

Shilenko Y. V., Leading Researcher of FSUE «State Research Institute of Biological Instrumentation», Moscow, Russia;

Yarkov S. P., Head of Department, Doctor of Biological Sciences of FSUE «State Research Institute of Biological Instrumentation», Moscow, Russia;

Khramov E. N., Director of the Institute, Doctor of Technical Sciences, Professor of FSUE «State Research Institute of Biological Instrumentation», Moscow, Russia.