

УДК 637.542.06 [577.182.46+577.164.187]

И. И. ВАШКЕВИЧ¹, Т. А. ПОЗНЯК², О. В. СВИРИДОВ¹

КОНСТРУКЦИЯ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ХЛОРАМФЕНИКОЛА В СЫРЬЕ И ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

¹ *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: sviridov@iboch.bas-net.by*

² *Белорусский государственный ветеринарный центр, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: sylver_ljo@mail.ru*

(Поступила в редакцию 22.11.2012)

В мировой практике для скрининговых исследований сельскохозяйственной продукции животного происхождения на содержание остаточных количеств токсичного антибиотика L-хлорамфеникола (Хф) в настоящее время применяется метод иммуноанализа в различных его вариантах: ферментно-колориметрическом [1], ферментно-хемилюминесцентном [2], флуоресцентном [3]. Иммуноанализ выполняется с помощью специальных лабораторных тест-систем или коммерческих наборов реагентов [4]. Отечественные технологии иммуноанализа хлорамфеникола в пищевых продуктах и сырье животного происхождения, соответствующие тест-системы микропланшетного формата и наборы реагентов в настоящее время отсутствуют. Для преодоления зависимости контрольных лабораторий Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от импорта данного вида изделий выдано задание на разработку набора реагентов для определения хлорамфеникола в сырье и продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа (ИФА) в рамках подпрограммы «Биотехнология в пищевой промышленности» ГП «Инновационные биотехнологии».

В этих исследованиях – на стыке двух наук (ветеринарной санитарии и аналитической биоорганической химии) – участвуют сотрудники двух учреждений. В предыдущем сообщении [5] нами подробно описаны и обсуждены методики получения и свойства специфических реагентов для иммуноферментного определения Хф. В данной работе полученные и охарактеризованные реагенты использованы для конструирования тест-системы ИФА-Хф, технические характеристики которой обеспечивают количественное определение Хф с высокой чувствительностью в широком диапазоне концентраций антибиотика при хорошей повторяемости результатов измерений. Оптимизированная тест-система путем технологической проработки легко трансформируется в коммерческий набор реагентов для иммуноферментного анализа Хф в сырье и продукции животного происхождения, что и является конечной целью нашей работы.

Материалы и методы исследования

Тест-система. Компоненты тест-системы ИФА-Хф формировали из реагентов, синтез и биотехнологические методы получения которых описаны нами ранее [5]. Готовая форма тест-системы состоит из 9 компонентов, имеющих следующие характеристики внешнего вида и содержания.

Иммуносорбент – герметично упакованный разборный планшет с 96 (12×8) прозрачными бесцветными лунками, покрытыми последовательно антикроличьими антителами, кроличьими антителами к Хф и стабилизирующим слоем.

Конъюгат (концентрированный раствор) – прозрачная бесцветная или светло-желтая жидкость (0,7 мл в 1 пластмассовой микропробирке или флаконе), содержащая продукт присоедине-

ния карбоксипроизводного Хф к остаткам лизина пероксидазы из корней хрена в составе специального буфера со стабилизирующими добавками.

Раствор для разведения конъюгата – прозрачная бесцветная жидкость (10 мл в 1 пластмассовом флаконе), содержащая белковые наполнители.

Калибровочные пробы – прозрачные бесцветные жидкости (по 0,6 мл в 6 пластмассовых микропробирках или флаконах) с возрастающими концентрациями антибиотика C_0 – C_5 : 0; 0,05; 0,1; 0,3; 1,0 и 5,0 нг/мл.

Контрольная проба – сухой порошок белого цвета, лиофилизована из 0,8 мл раствора в 1 пластмассовом флаконе (после восстановления путем добавления воды концентрация Хф находится в интервале 0,2–0,4 нг/мл).

Раствор для разведения исследуемых проб (концентрат) – опалесцирующая или прозрачная бесцветная жидкость (допускается ее расслоение и выпадение незначительного осадка), которая после разведения водой соответствует по свойствам калибровочной пробе с нулевой концентрацией Хф, 20 мл в 1 пластмассовом флаконе.

Промывочный раствор (концентрат) – опалесцирующая или прозрачная бесцветная жидкость, содержащая детергент (допускается ее расслоение и выпадение незначительного осадка), 20 мл в 1 пластмассовом флаконе.

Субстратный буферный раствор – прозрачная бесцветная жидкость, главным ингредиентом которой является перекись водорода, 14 мл в 1 пластмассовом флаконе.

Раствор ТМБ – прозрачная бесцветная жидкость, содержащая 3,3',5,5'-тетраметилбензидин в качестве хромогена, 0,7 мл в 1 пластмассовом флаконе.

Стоп-реагент – прозрачная бесцветная жидкость, представляющая собой разбавленный (0,5 М) раствор серной кислоты, 14 мл в 1 пластмассовом флаконе.

Подготовка компонентов к ИФА. Перед использованием компоненты тест-системы выдерживали при температуре 22–25 °С в течение 0,5 ч. Во флакон с сухим порошком контрольной пробы добавляли 0,8 мл дистиллированной воды, нагретой до температуры 40±2 °С, и аккуратно перемешивали на вихревом смесителе, избегая образования пены. До начала анализа пробу оставляли в восстановленном виде минимум на 15 мин. Содержимое флакона с концентратом раствора для промывания планшета интенсивно встряхивали в течение 10–20 с, в случае присутствия кристаллов подогревали на водяной бане или помещали в ультразвуковую баню. Затем разводили нужный объем промывочного раствора в 10 раз деионизованной или дистиллированной водой (объемные части 1+9) и перемешивали. Концентрат раствора для разведения исследуемых проб продуктов в экспериментах по установлению технических характеристик тест-системы ИФА-Хф не использовался, поэтому его подготовка к работе в данной статье не описывается. Рабочий раствор конъюгата приготавливали непосредственно перед использованием путем разведения соответствующего концентрата в 11 раз (объемные части 1+10) раствором для разведения конъюгата из расчета 50 мкл разбавленного раствора на каждую из заданного количества лунок планшетного иммуносорбента. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 мл вносили необходимое количество раствора для разведения, добавляли заданное количество концентрата конъюгата и тщательно перемешивали круговыми движениями, не допуская образования пены. Также непосредственно перед использованием готовили хромоген-субстратную смесь путем разбавления раствора ТМБ субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1:20) из расчета 100 мкл на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон из темной пластмассы вместимостью 20 мл вносили необходимое количество субстратного буферного раствора, добавляли соответствующее количество раствора ТМБ и интенсивно перемешивали в течение 30–40 с. Иммуносорбент освобождали от упаковочного пакета, и необходимое для одной постановки ИФА количество полосок с лунками (стрипов) оставляли в рамке планшета.

Выполнение ИФА и обработка данных. Из каждого флакона с калибровочными пробами C_0 – C_5 и с растворенной контрольной пробой отбирали по 0,05 мл раствора и вносили в лунки. Затем во все лунки добавляли по 0,05 мл раствора конъюгата в рабочем разведении. Перемешивали содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности

лабораторного стола. Планшет заклеивали изолирующим листком или закрывали крышкой и инкубировали при температуре 22–25 °С в течение 1 ч. После окончания инкубации приготовленным раствором для промывания проводили 4-кратную промывку планшета, добавляя в каждую лунку по 0,25 мл раствора. В процессе ручной промывки содержимое из всех лунок удаляли путем резкого переворачивания планшета или аспирации, а на последнем этапе удаляли остатки влаги, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой. После промывки в каждую лунку вносили по 0,1 мл свежеприготовленного раствора хромоген-субстратного проявителя. Планшет вновь заклеивали изолирующим листком или закрывали крышкой и инкубировали при 22–25 °С в темноте течение 10–15 мин. Наблюдали окрашивание содержимого лунок в синий цвет. Ферментативную реакцию останавливали путем внесения во все лунки планшета по 0,1 мл стоп-реагента, при этом растворы в лунках меняли синий цвет на желтый. Далее перемешивали содержимое лунок круговым движением планшета по ровной поверхности лабораторного стола и не позже чем через 15 мин. после остановки реакции измеряли в многоканальном планшетном спектрофотометре АИФ М/340 (Беларусь) или Stat Fax 3200 (США) оптическую плотность (ОП) растворов во всех лунках при длине волны 450 нм.

При обработке полученных экспериментальных данных рассчитывали средние арифметические значения ОП для каждой пары лунок с калибровочными пробами и в полулогарифмических координатах строили график зависимости усредненного колориметрического сигнала (ось ординат, линейная) от концентрации Хф в калибровочных пробах (ось абсцисс, логарифмическая). По калибровочному графику или показателям связывания меченого Хф в отдельных лунках определяли характеристики отдельного компонента или тест-системы в целом.

Для расчета значения чувствительности ИФА находили среднее арифметическое значение ОП для 10 лунок с пробой C_0 и определяли величину среднего квадратичного отклонения (SD) по формуле (1):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (B_i - \bar{B})^2}{n-1}}, \quad (1)$$

где B_i – значение ОП каждого измерения в лунках с пробой C_0 ; \bar{B} – среднее арифметическое значение ОП в лунках с пробой C_0 ; n – число измерений ($n = 10$).

Строили калибровочные графики зависимости колориметрического сигнала (ось ординат) от концентрации Хф в калибровочных пробах, нг/мл (ось абсцисс) для двух интервалов концентраций (C_0 – C_2 в линейных координатах; C_1 – C_5 – ось ординат линейная, ось абсцисс логарифмическая). Если значения ординат графика « C_1 – C_5 » корректировались путем линейной аппроксимации, то соответствующие значения переносились на график « C_0 – C_2 ». На оси ординат графика « C_0 – C_2 » откладывали значение \bar{B}_0 минус $2SD$. Из полученной точки проводили прямую, параллельную оси абсцисс, до пересечения с калибровочной кривой. Из точки пересечения опускали перпендикуляр на ось абсцисс. Соответствующая этому значению концентрация давала значение минимальной достоверно определяемой концентрации Хф в калибровочных пробах.

Для определения содержания Хф в контрольной пробе рассчитывали среднее арифметическое значение ОП в 12 лунках с внесенной контрольной пробой. По калибровочному графику находили соответствующее значение концентрации Хф в нг/мл.

При расчетах коэффициента вариации результатов измерений (К.В.) для каждого значения ОП в лунках с контрольной пробой по калибровочному графику определяли соответствующую концентрацию Хф в нг/мл. Рассчитывали К.В. в процентах по формуле (2):

$$К.В. = \frac{100}{C} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}{n-1}}, \quad (2)$$

где C_i – значение концентрации Хф для каждого измерения в лунках, нг/мл; \bar{C} – среднее значение концентрации Хф в лунках, нг/мл; n – число измерений ($n = 12$).

Определение стабильности компонентов. Устойчивость компонентов тест-системы ИФА-Хф при хранении и под действием физических факторов определяли в специальных экспериментах. Для установления ориентировочных сроков хранения компонентов в надлежащих условиях контрольные образцы выдерживали в холодильнике при температуре около 4 °С, а опытные помещали в термостат при температуре 37 °С и подвергали «ускоренному старению» в течение разных промежутков времени. В последующих расчетах использовали эмпирическую формулу (3):

$$t_{\text{xp}} = t_{\text{ст}} \cdot 3^{\frac{T_{\text{ст}} - T_{\text{xp}}}{10}}, \quad (3)$$

где t_{xp} и $t_{\text{ст}}$ – время хранения и старения соответственно, сут.; T_{xp} и $T_{\text{ст}}$ – температура хранения и старения соответственно, °С.

Результаты и их обсуждение

Разработанная тест-система ИФА-Хф состоит из 9 компонентов, принцип ее работы отражает рис. 1. В лунках микропланшета, содержащих подготовленные реагенты и анализируемые пробы, во время инкубации конъюгат Хф-пероксидазы и Хф в составе пробы конкурируют за связывание с поликлональными антителами к Хф, биоспецифически иммобилизованными через антивидовые антитела на внутренней поверхности лунок: чем больше содержится Хф в пробе, тем меньше конъюгата связывается с антителами на твердой фазе. После отмытия несвязавшихся реагентов в лунки вносят раствор субстрата пероксидазы (пероксид водорода) и хромогена (ТМБ). Развивается цветная реакция, которую останавливают путем добавления стоп-реагента (0,5 М раствор серной кислоты). Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на спектрофотометре как величину ОП при длине волны 450 нм. Величина ОП обратно пропорциональна концентрации Хф в пробе. Эту зависимость представляют в виде калибровочного графика, типичный вид которого показан на рис. 2. По калибровочному графику можно определить содержание Хф в исследуемых пробах.

На качество анализа влияют технические характеристики тест-системы, которые можно оценить путем обработки экспериментальных данных ИФА. В свою очередь, на результаты ИФА влияют условия и некоторые технические приемы методики ИФА. Нами выработаны следующие рекомендации, относящиеся к технике выполнения анализа и улучшающие его характеристики. В одной постановке ИФА желательно использовать не более четырех стрипов (32 лунки) с тем, чтобы сократить время между внесением первой и последней пробы и тем самым нивелировать возможные различия сигналов в лунках, обусловленные разным временем протекания иммунохимической реакции. Суммарное время внесения анализируемых проб и конъюгата не должно превышать 15 мин. с тем, чтобы минимизировать возможные артефакты, также обусловленные разным временем инкубации системы в первых и последних лунках. Общее время добавления

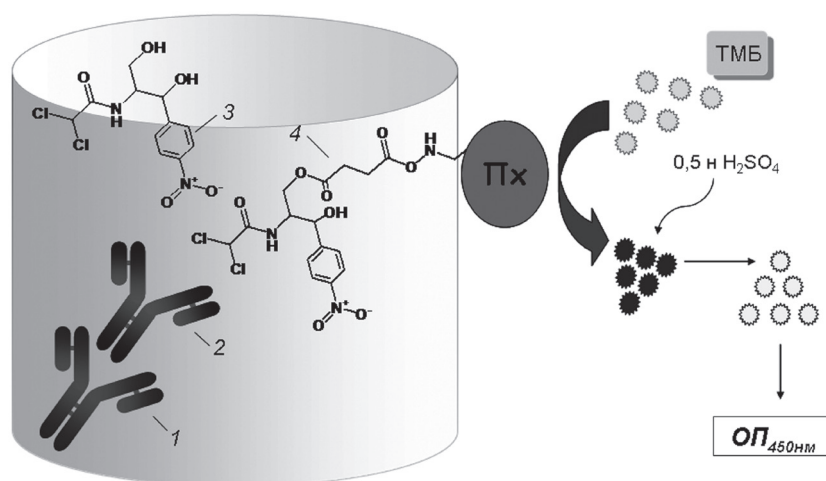


Рис. 1. Конструкция и принцип действия иммуноферментной тест-системы для количественного определения хлорамфеникола: 1 – антивидовое антитело, 2 – антитело к хлорамфениколу, 3 – хлорамфеникол, 4 – конъюгат гемисукцината хлорамфеникола и пероксидазы хрена

свежеприготовленного хромоген-субстратного раствора во все лунки не должно быть более 2 мин. На стадии остановки ферментативной реакции рекомендуется вносить в лунки стоп-реагент в той же последовательности и с той же скоростью, которые использовались при добавлении хромоген-субстратного раствора. Очень полезно соблюдать определенные правила промывания планшета. На каждом этапе промывания нужно контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости из них. Нельзя допускать переполнения лунок и перетекания жидкости между ними. Необходимо выдерживать лунки, заполненные раствором для отмывания планшетов, не менее 10 с. Некачественное промывание планшета приводит к получению высокого фонового сигнала и некорректным результатам измерений.

В таблице приведены значения технических характеристик тест-системы ИФА-Хф, усредненные по результатам независимых ИФА, которые были выполнены в ходе лабораторных испытаний тест-системы в отделе контроля продуктов питания ГУ «Белорусский государственный ветеринарный центр».

Технические характеристики тест-системы ИФА-Хф

Показатель	Предписанное значение	Полученное значение
V_0 , опт. ед.	От 1,3 до 2,7	1,78
V_1/V_0 , %	От 70 до 90	74,1
V_5/V_0 , %	От 5 до 30	7,5
Чувствительность, нг/мл	Не более 0,025	0,020
Концентрация Хф в контрольной пробе, нг/мл	От 0,2 до 0,4	0,35
К.В., %	Не более 10	5,9

Примечание. V_0 – V_5 – ОП в лунках, содержащих калибровочные пробы с увеличивающейся концентрацией. (C_0 – C_5) Хф, измеряемые в оптических единицах.

Установленные в результате испытаний технические характеристики тест-системы ИФА-Хф соответствуют требованиям качества иммуноанализа и обеспечивают количественное определение Хф в сельскохозяйственной продукции животного происхождения [1–4].

Потребительские свойства иммуноаналитической системы и надежность ее применения для практических целей в готовой форме ИФА-набора, т. е. эксплуатационные характеристики, определяются не только техническим уровнем изделия, но и устойчивостью компонентов тест-системы к внешним воздействиям. Нами были экспериментально найдены показатели, которые наиболее эффективно отражают стабильность конкретных компонентов системы ИФА-Хф. Так, для калибровочных и контрольной проб таким показателем оказалось соотношение V_i/V_0 . Эксперименты показали, что при повышенной температуре менее устойчивы во времени растворы проб с низкой концентрацией антибиотика. На основании этого можно сделать рекомендации о необходимости хранения калибраторов при температуре около 4 °С. Лиофилизованная форма контрольной пробы оказалась весьма устойчивой к температурному воздействию в течение длительного промежутка времени. В отдельном эксперименте мы нашли, что в результате однократного замораживания и оттаивания раствора контрольной пробы значение V_i/V_0 падает в среднем на 55%. Этот факт следует учитывать при выборе условий хранения этого компонента тест-системы после его подготовки к работе путем растворения. Конъюгат как компонент тест-системы представляет собой продукт присоединения гемисукцината Хф к ферменту. Его ста-

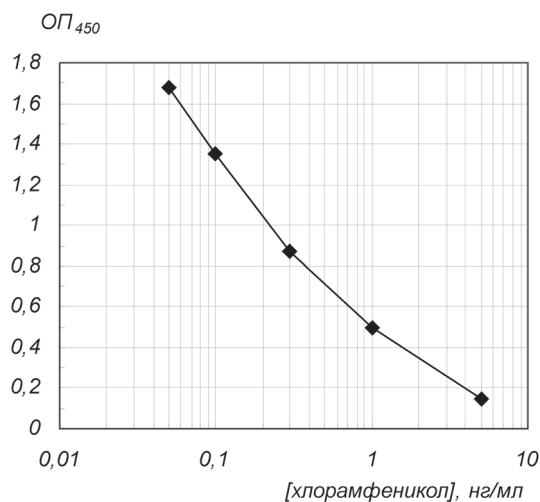


Рис. 2. Типичный калибровочный график, полученный с использованием тест-системы ИФА-хлорамфеникол

бильность складывается из устойчивости к воздействиям физико-химических факторов самой молекулы антибиотика, химических связей между Хф и ферментом, а также макромолекулы фермента. Выбранный нами параметр V_0 суммарно отражал иммунореактивность антигенной части конъюгата и каталитическую активность пероксидазы в эксперименте по «ускоренному старению». Найдено, что концентрат конъюгата гораздо более стабилен, чем подготовленный к работе разбавленный компонент. Однако в связи с некоторой чувствительностью концентрированного раствора конъюгата к тепловому воздействию его рекомендуется хранить при температуре холодильника. В иммуносорбенте к повреждающим воздействиям могут быть чувствительны силы физической адсорбции между полистирольной поверхностью лунки и молекулой антивидавого антитела, силы биоспецифического сродства между антивидовым (вторичным) антителом и антителом к Хф и, наконец, нековалентные связи первичного антитела с антигеном. Поэтому в результате естественного или ускоренного старения иммуносорбент может терять Хф-связывающую емкость или снижать свой аффинитет по отношению к Хф. Эти процессы можно обнаружить и даже дифференцировать, измеряя показатели V_0 , V_1 и V_5 . Так, в условиях, имитирующих в ускоренном режиме деструктивные процессы при старении компонента тест-системы, иммуносорбент хорошо сохранял сродство к Хф и его производному (V_1 и V_0), а также свою антигенсвязывающую емкость (V_5). В целом эксперименты по ускоренному старению показали, что компоненты тест-системы ИФА-Хф являются устойчивыми иммунохимическими реагентами, допускающими длительное хранение при температуре около 4 °С и надежное применение в ИФА при комнатной температуре.

Заключение. Разработанная иммуноферментная тест-система ИФА-Хф имеет современную микропланшетную конструкцию, основана на принципе конкурентного связывания определяемого и меченного ферментом Хф с поликлональными антителами к Хф, биоспецифически иммобилизованными в лунках микропланшета, содержит эффективные вспомогательные реагенты и дает возможность одновременно проанализировать 96 проб на содержание Хф. Технические характеристики тест-системы соответствуют требованиям контроля безопасности продуктов питания, сырья и продукции животного происхождения. Изделие устойчиво при хранении и применении в обычных лабораторных условиях.

Литература

1. *Campbell, G. S.* Detection and quantitation of chloramphenicol by competitive enzyme-linked immunoassay / G. S. Campbell, R. P. Mageau, B. Schwab, R. W. Johnston // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1984. – Vol. 25. – P. 205–211.
2. Chemiluminescence immunoassay for chloramphenicol / S. Lin [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2005. – Vol. 382. – P. 1250–1255.
3. *Гасилова, Н. В.* Определение хлорамфеникола в молоке методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа / Н. В. Гасилова, С. А. Еремин // *Ж. аналит. химии.* – 2010. – Т. 65. – С. 261–265.
4. Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of chloramphenicol RIDASCREEN® CHLORAMPHENICOL: инструкция по применению набора реагентов – R-Biopharm AG, Germany, 2010. – 32 с.
5. Получение и свойства реагентов для иммуноферментного анализа хлорамфеникола в сырье и продукции животного происхождения / И. И. Вашкевич [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2012. – № 4. – С. 57–65.

I. I. VASHKEVICH, T. A. POZNYAK, O. V. SVIRIDOV

CONSTRUCTION AND TECHNICAL CHARACTERISTICS OF THE TEST SYSTEM FOR CHLORAMPHENICOL ENZYME IMMUNOASSAY IN FOOD OF ANIMAL ORIGIN

Summary

An enzyme immunoassay system for the quantitative chloramphenicol determination in foods of animal origin has been developed and tested. The principal components of the system structure are a detachable 96-well microplate-based immunosorbent, control and calibration samples and a conjugate of chloramphenicol with horse reddish peroxidase. Immunochemical interaction among these components proceeds at a room temperature for 1 h and ensures high indices of sensitivity (0.02 ng/ml), repeatability (coefficient of variation – 6%) and a concentration range (up to 5 ng/ml). The technical characteristics of the test-system meet the requirements of enzyme immunoassay quality as well as the demands of a safety control of agricultural products. It has been shown in special experiments that a finished form of the system is stable during storage or use under laboratory conditions.