

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Синьгов Е.К.¹, Моренков О.С.², Сипин С.В.¹, Врублевская В.В.²

Разработка и валидация иммунохроматографической тест-системы для определения микроцистинов в воде и тканях пресноводных рыб

¹ФГУП «Научный центр "Сигнал"», 107014, Москва, Российская Федерация;²Институт биофизики клетки ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 142290, Московская область, Пущино, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Введение. Отдельные роды цианобактерий продуцируют гепатотоксины, относящиеся к группе микроцистинов (МЦ). В периоды «цветения» воды зарегистрированы случаи отравления и гибели рыб, птиц, диких и домашних животных, а также человека, связанные с потреблением воды, сине-зеленых водорослей или других гидробионтов, контаминированных МЦ. Своевременное выявление МЦ в водохранилищах, в питьевой воде и гидробионтах является основой для проведения профилактических мероприятий по предупреждению отравления людей и животных микроцистинами.

Результаты. Разработана иммунохроматографическая тест-система для определения МЦ в питьевой воде, воде пресных водоемов и тканях рыб. При визуальном учете результатов анализа пороговая чувствительность тест-системы при определении МЦ-LR составляла не более 0,1 нг/мл для питьевой воды и не более 0,5 нг/мл для речной и озерной воды, что ниже установленных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Роспотребнадзором предельных допустимых концентраций (ПДК) для МЦ-LR. При анализе тканей рыб пороговая чувствительность тест-системы составляла не более 3 нг/г ткани. Использование инструментального способа учета результатов приводило к снижению в 2–3 раза минимальной определяемой концентрации МЦ-LR. Тест-система позволяла проводить полуколичественное определение содержания МЦ в воде и тканях рыб и с различной эффективностью выявляла разные виды МЦ и структурно близкий гепатотоксин нодуларин.

Ограничения исследования. Тест-система не позволяет выявлять некоторые виды МЦ, однако определяет наиболее распространённые и опасные виды, в том числе МЦ-LR.

Заключение. Разработанная тест-система может быть использована для мониторинга содержания МЦ в питьевой воде, воде открытых водоемов и в тканях рыб.

Ключевые слова: микроцистины; нодуларин; цианобактерии; иммунохроматографическая тест-система

Соблюдение этических стандартов. Исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Для цитирования: Синьгов Е.К., Моренков О.С., Сипин С.В., Врублевская В.В. Разработка и валидация иммунохроматографической тест-системы для определения микроцистинов в воде и тканях пресноводных рыб. *Токсикологический вестник*. 2024; 32(3): 187–194. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2024-32-3-187-194>

Для корреспонденции: Врублевская Вероника Валерьевна, кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник Институт биофизики клетки ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Московская область, Пущино, Российская Федерация. E-mail: v_vrublevskaya@mail.ru

Участие авторов. Все соавторы внесли равнозначный вклад в исследование и подготовку статьи к публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в соответствии с планами проведения научно-исследовательских работ ФГУП «Научный центр "Сигнал"» и Института биофизики клетки ФИЦ «ПНЦБИ РАН».

Поступила в редакцию: 18.12.2023 / Принята в печать: 05.05.2024 / Опубликовано: 28.06.2024

Evgeny K. Singov¹, Oleg S. Morenkov², Sergey V. Sipin¹, Veronika V. Vrublevskaya²

Development and validation of an immunochromatographic test system for the determination of microcystins in water and tissues of freshwater fish

¹Federal State Unitary Enterprise "Scientific Center "Signal", 107014, Moscow, Russian Federation;

²Institute of Cell Biophysics, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", 142290, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

RESUME

Introduction. Certain genera of cyanobacteria produce hepatotoxins associated with the group of microcystins (MCs). During periods of water blooms, cases of poisoning and death of fish, birds, wild and domestic animals, as well as humans, associated with the consumption of water, blue-green algae or other aquatic organisms contaminated with MC, have been recorded. Timely detection of MC in water reservoirs, in drinking water and in hydrobionts is necessary for carrying out preventive measures to prevent poisoning of people and animals with microcystins.

Results. An immunochromatographic test system has been developed for the determination of MC in drinking water, fresh water and fish tissues. When using the visual method of recording the results, the detection limit of the test system for determining MC-LR was no more than 0.1 ng/ml for drinking water and no more than 0.5 ng/ml for river and lake water, which is lower than maximum allowable concentration for MC-LR established by the World Health Organization (WHO) and Rospotrebnadzor. When analyzing fish tissues, the detection limit of the test system was no more than 3 ng/g tissue. The use of an instrumental method for recording results led to a 2–3-fold decrease in the minimum detectable concentration of MC-LR. The test system allowed semi-quantitative determination of MC content in water and fish tissues and detected different types of MC and the structurally similar hepatotoxin nodularin with varying efficiency.

Limitations. The test system does not allow the detection of some types of MC, but it identifies the most widespread and dangerous types, including MC-LR.

Conclusion. The developed test system can be used to monitor the content of MC in drinking water, water from open reservoirs and in fish tissues.

Keywords: *microcystins; nodularin; cyanobacteria; immunochromatographic test system*

Compliance with ethical standards. The study does not require of the conclusion of the biomedical ethics committee or other documents.

For citation: Singov E.K., Morenkov O.S., Sipin S.V., Vrublevskaya V.V. Development and validation of an immunochromatographic test system for the determination of microcystins in water and tissues of freshwater fish. *Toksikologicheskiy vestnik / Toxicological Review*. 2024; 32(3): 187–194. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2024-32-3-187-194> (In Russian)

For correspondence: *Veronika V. Vrublevskaya*, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Institute of Cell Biophysics, Pushchinsky Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, 142290, Moscow Region, Pushchino, Russian Federation. E-mail: v_vrublevskaya@mail.ru

Authors contribution. All co-authors made an equal contribution to the research and preparation of the article for publication.

Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was carried out in accordance with the research plans of the Federal State Unitary Enterprise "Scientific Center "Signal" and the Institute of Cell Biophysics of the Federal Research Center "PSCBI RAS".

Received: December 18, 2023 / Accepted: May 5, 2024 / Published: June 1=28, 2024

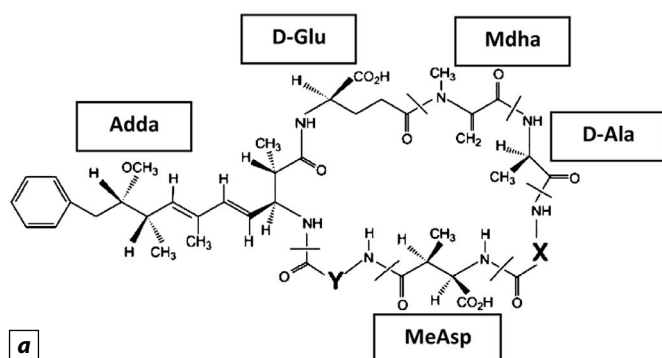
Введение

Микроцистины (МЦ) относятся к большой группе гепатотоксических фикотоксинов, которые считаются наиболее важными среди пресноводных цианотоксинов из-за их устойчивости к биологическому и химическому распаду, широкому распространению и способности накапливаться в высоких концентрациях в воде во время ее цветения [1–4]. Микроцистины продуцируются цианобактериями родов *Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Phormidium*, *Synechococcus* и др. [1–4]. В период массового размножения токсигенных цианобактерий, продуцирующих МЦ, содержание МЦ в воде может превышать предельно допустимые концентрации в тысячи раз [1–4]. Рыбы контаминируются МЦ посредством прямого потребления МЦ-содержащего фитопланктона через пищевую цепь или посредством пассивного проникновения токсина в организм через жабры или кожу [5]. В мире зарегистрированы многочисленные эпизоды отравления и гибели рыб, птиц и домашних животных, а также отравления людей, обусловленные присутствием МЦ в воде [4–8]. Острое отравление человека МЦ сопровождается болями в желудке, спазмами кишечника, тошнотой, рвотой, поносом, головной болью, болями в мышцах и суставах и приводит к поражению печени. Длительное поступление токсинов в ор-

ганизм человека может провоцировать развитие онкологических заболеваний [9]. На территории Российской Федерации МЦ выявлены в озере Сестрорецкий разлив, водах Ладожского озера и Байкала [10–13], в Котокельском озере [14], в Усть-Илимском [12], Шершневском [10], Цимлянском [15], Берешском [16] и ряде других водохранилищ.

К настоящему времени идентифицировано более 250 видов МЦ [17]. Микроцистины относятся к циклическим гептапептидам и имеют сходную структуру, включающую в себя пять неизменяемых и две изменяемые аминокислоты [3, 4] (рис. 1). Каждому индивидуальному МЦ приписывается двухбуквенный суффикс для обозначения изменяемых аминокислот. Например, у наиболее распространенного и одного из наиболее токсичных видов микроцистинов – МЦ-LR, изменяемыми аминокислотами являются лейцин (L) и аргинин (R) (см. рис. 1). К группе МЦ относят и структурно родственный гепатотоксин нодуларин. Особенностью МЦ и нодуларина является присутствие в их составе уникальной β -аминокислоты Adda, характерной исключительно для этих соединений. Часто один вид цианобактерий продуцирует несколько видов МЦ, существенно различающихся по токсичности [2–4].

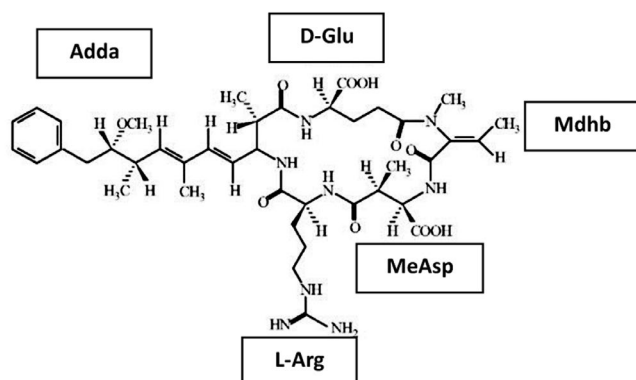
Надёжное и своевременное обнаружение разных видов МЦ и нодуларина в водохранилищах, в питьевой воде и в тканях рыб является основой



a

Наименование микроцистина	X	Y
Микроцистин-LR	Лейцин (L)	Аргинин (R)
Микроцистин-LA	Лейцин (L)	Аланин (A)
Микроцистин-LF	Лейцин (L)	Фенилаланин (F)
Микроцистин-LL	Лейцин (L)	Лейцин (L)
Микроцистин-LW	Лейцин (L)	Триптофан (W)
Микроцистин-LY	Лейцин (L)	Тирозин (Y)
Микроцистин-RR	Аргинин (R)	Аргинин (R)
Микроцистин-YR	Тирозин (Y)	Аргинин (R)
Микроцистин-WR	Триптофан (W)	Аргинин (R)

б



в

Рис. 1. Обобщённая структура микроцистинов (а), примеры различных видов микроцистинов (б) и структура нодуларина (в).

Adda – уникальная β -аминокислота (3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенил-дека-4,6-диеновая кислота); Mdha – N-метилдегидроаланин; Mdhb – N-метилдегидробутирин; MeAsp – D-эритро- β -метиласпарагиновая кислота; D-Glu – D-глутамин; D-Ala – D-аланин; L-Arg – L-аргинин.

Fig. 1. Generalized structure of microcystins (a), examples of different types of microcystins (b) and structure of nodularin (в).

Adda is a unique β -amino acid (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-deca-4,6-dienoic acid); Mdha – N-methyldehydroalanine; Mdhb – N-methyldehydrobutyrine; MeAsp – D-erythro- β -methylaspartic acid; D-Glu – D-glutamine; D-Ala – D-alanine; L-Arg – L-arginine.

для осуществления мероприятий по предупреждению отравления этими токсинами людей и животных. Всемирной организацией здравоохранения установлен предел содержания МЦ-LR в питьевой воде – 1 нг/мл и в рекреационной воде – 10 нг/мл [18, 19]. В России также нормируется допустимое содержание МЦ-LR в питьевой воде и воде подземных и поверхностных водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования на уровне 0,001 мг/л [20]. Несмотря на то, что содержание МЦ в рыбе в период цветения воды может достигать 300 нг/г съедобных тканей рыб, допустимое содержание МЦ в рыбах не регламентировано [21].

Для обнаружения МЦ используют высокоэффективную жидкостную хроматографию, иммуноферментные и иммунохроматографические методы. Иммунохроматографические методы сочетают в себе высокую чувствительность, специфичность, простоту, скорость проведения анализа, а также возможность проведения анализа «на месте» [22–28]. В России разработаны методы иммунохроматографического определения МЦ [22, 28], однако до настоящего времени выпуск отечественных иммунохроматографических тест-систем для выявления МЦ не был налажен.

С практической точки зрения особый интерес представляют иммунохроматографические тест-системы для обнаружения МЦ в разных типах субстратов, в которых используется способ визуальной оценки результатов анализа.

Цель работы – разработка и валидация простой, чувствительной и специфичной иммунохроматографической тест-системы с визуальной детекцией для выявления и полуколичественного определения МЦ и нодуларина в питьевой воде, пресной воде открытых водоемов и тканях рыб.

Материал и методы

МЦ-LR конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином (БСА) по карбоксильной группе МЦ-LR с использованием карбодиимидного метода [29]. Частицы коллоидного золота (ЧКЗ) со средним размером 35 ± 5 нм получали по методу Френса [30]. Размер ЧКЗ определяли методом просвечивающей электронной микроскопии. Конъюгаты моноклональных МЦ-специфических антител (анти-МЦ антитела) с ЧКЗ (детектирующий анти-МЦ-ЧКЗ конъюгат) и конъюгаты антител против IgG человека (анти-hIgG антитела) с ЧКЗ (анти-hIgG-ЧКЗ конъюгат сравнения) получали методом пассивной сорбции антител на поверхность ЧКЗ.

На иммунохроматографических тест-полосках иммобилизовали три линии иммунореагентов: тестовую линию (Т), линию сравнения (С) и контрольную линию (К) (рис. 2, см. на вклейке). Для этого на нитроцеллюлозную мембрану HiFlowPlus 180 Millipore (США), наклеенную на адгезивную пластиковую подложку, наносили в виде линий конъюгат МЦ-БСА (тестовая линия), очищенные IgG человека (линия сравнения) и антитела против IgG мышей (контрольная линия) с использованием автоматического диспенсера XYZ3050 BioDot (США). На тест-полоске имеется стекловолокнистый фильтр Millipore (США) с высушенными анти-МЦ-ЧКЗ- и анти-hIgG-ЧКЗ-конъюгатами, целлюлозный фильтр для образцов и абсорбирующий целлюлозный фильтр. Тест-полоски упакованы в герметичные фольгированные пакеты с силикагелем. В тест-систему для экспресс-определения МЦ в воде и пресноводной рыбе вложен раствор для разведения проб (20X-концентрат). Производство разработанной тест-системы для экспресс-определения МЦ в воде и пресноводной рыбе налажено ФГУП «НЦ "Сигнал"».

В работе использовали образцы питьевой воды, речной или озерной воды (река Ока и ряд озер Серпуховского района), а также ткани пресноводных рыб (каarp, толстолобик, белый амур). Предварительно образцы воды и тканей рыб проверяли на содержание МЦ с использованием Microcystins/Nodularins-ELISA (Abraxis (США)). Образцы воды или гомогенатов тканей рыб, не содержащие МЦ, контаминировали разными видами МЦ и проводили подготовку образцов для анализа. При анализе питьевой воды предварительная подготовка образцов не требовалась. При определении суммарного содержания МЦ в пресной воде открытых водоемов (растворенный в воде и клеточно-ассоциированный МЦ), подготовка образцов для анализа включала в себя трехкратное замораживание/оттаивание образцов воды для лизиса клеток, после чего образцы фильтровали через стекловолокнистый фильтр с размером пор 1,0–1,5 мкм Millipore (США) и разводили дистиллированной водой в 5 раз. При оценке содержания растворенного в воде открытых водоемов МЦ (без учета клеточно-ассоциированного МЦ) подготовку образцов воды для анализа проводили, как описано выше, за исключением того, что замораживание/оттаивание не осуществляли. Подготовка образцов тканей рыб включала в себя гомогенизацию тканей рыб, экстрагирование двумя объемами метилового спирта при активном перемешивании и осветле-

нии центрифугированием (12 000 g, 10 мин). Метанольный экстракт разводили дистиллированной водой в 10 раз (общая кратность разведения 30 раз).

После проведения необходимой подготовки образцов для анализа, непосредственно перед анализом к образцам добавляли 1:20 часть 20-кратного концентрата буферного раствора, вложенного в тест-систему.

При проведении анализа тест-полоски из тест-системы погружали на 5–8 с в микропробирку с подготовленными анализируемыми пробами до уровня, указанного стрелками на защитной пленке на тест-полосках. Тест-полоски располагали на горизонтальной поверхности и через 20 мин фиксировали результаты визуально или инструментальным способом с помощью разработанного ридера иммунохроматографических тест-полосок. При визуальном способе учета результатов, положительными (содержащими МЦ) считались пробы, при анализе которых визуально наблюдалось достоверное снижение интенсивности окрашивания тестовой линии относительно линии сравнения. Для полуколичественного определения концентрации МЦ в образцах использовали шкалу интерпретации результатов, вложенную в тест-систему. При инструментальном способе оценки результатов тест-полоски помещали в кассеты и с помощью ридера определяли концентрацию МЦ в пробе по величине ингибирования интенсивности окрашивания тестовой линии относительно линии сравнения с использованием калибровочной кривой, заложенной в ПО ридера.

Для расчета содержания МЦ в исходных образцах воды открытых водоемов и в тканях рыб установленную концентрацию МЦ в пробе умножали на кратность разведения образцов для анализа: 5 для воды открытых водоемов и 30 для тканей рыб.

Для оценки эффективности тест-системы в выявлении различных видов МЦ проводили определение перекрестной реактивности тест-системы с различными видами МЦ (МЦ-LR, МЦ-RR, МЦ-LR[D-Asp3], МЦ-HtyR, МЦ-RR[D-Asp3], МЦ-WR, МЦ-YR, МЦ-LF, МЦ-LY и МЦ-LW) и нодуларином. Токсины анализировали в концентрациях 0,1–10 нг/мл, результаты фиксировали инструментально. Эффективность выявления различных токсинов с использованием тест-системы оценивали, сравнивая 50% ингибирующие концентрации различных видов МЦ и 50% ингибирующую концентрацию МЦ-LR. Эффективность выявления тест-системой МЦ-LR принимали за 100%.

Результаты

На основе метода определения МЦ лежит прямой конкурентный вариант иммунохроматографического анализа, в котором МЦ исследуемой пробы и МЦ, иммобилизованный на мембране в области тестовой линии в составе конъюгата МЦ-БСА, конкурируют между собой за связывание с МЦ-специфическими антителами детектирующего анти-МЦ-ЧКЗ конъюгата (рис. 2, см. на вклейке). В процессе анализа исследуемая проба впитывается в фильтр для конъюгатов и растворяет высушенные на фильтре детектирующий анти-МЦ-ЧКЗ-конъюгат и анти-hIgG-ЧКЗ-конъюгат сравнения, которые двигаются по мембране под действием капиллярных сил и реагируют с иммобилизованными на мембране иммунореагентами. В отсутствие МЦ в пробе анти-МЦ-ЧКЗ-конъюгат связывается с конъюгатом МЦ-БСА в области тестовой линии и окрашивает ее. При наличии МЦ в пробе происходит взаимодействие МЦ с анти-МЦ-ЧКЗ-конъюгатом, что приводит к ингибированию его связывания с МЦ-БСА в области тестовой линии; при этом наблюдается снижение интенсивности окрашивания тестовой линии или тестовая линия не окрашивается. Анти-hIgG-ЧКЗ-конъюгат сравнения не связывается в области тестовой линии, но реагирует с иммунореагентом, иммобилизованным в области линии сравнения. Линия сравнения окрашивается всегда с одной и той же интенсивностью, независимо от типа исследуемого образца и концентрации МЦ в растворе. В процессе изготовления тест-системы соотношения реагентов отстраивают таким образом, чтобы интенсивность окрашивания тестовой линии и линии сравнения были сопоставимы. Оценка наличия МЦ в образце осуществляется по снижению интенсивности окрашивания тестовой линии относительно линии сравнения. Контрольная линия окрашивается всегда, независимо от типа субстрата и концентрации МЦ в пробах, что свидетельствует о правильности постановки анализа (см. рис. 2 на вклейке).

При оценке пороговой чувствительности тест-системы исходные образцы питьевой и пресной воды открытых водоемов, а также ткани рыб, контаминировали МЦ-LR, проводили подготовку образцов и последующий анализ на содержание МЦ. Репрезентативные результаты при использовании визуального способа регистрации результатов представлены на рис. 3 (см. на вклейке).

Интенсивность окрашивания линии сравнения была одинакова при анализе питьевой воды, воды открытых водоёмов и экстрактов гомогенатов

**Перекрёстная реактивность
иммунохроматографической тест-системы
в выявлении различных видов микроцистинов
и нодуларина**

**Cross-reactivity of the immunochromatographic test
system in the detection of various types of microns
and nodularin**

Вид микроцистина	Эффективность выявления различных видов микроцистинов и нодуларина, %
МЦ-LR	100
МЦ-LR[D-Asp3]	71 ± 10
МЦ-RR	67 ± 9
МЦ-HtyR	83 ± 8
МЦ-RR[D-Asp3]	35 ± 7
МЦ-YR	92 ± 9
МЦ-WR	47 ± 7
Нодуларин	24 ± 5

тканей рыб; присутствие МЦ-LR даже в концентрации 10 нг/мл в анализируемых образцах также не влияло на интенсивность окрашивания линии сравнения. МЦ-LR дозозависимо ингибировал интенсивность окрашивания тестовой линии. При визуальной регистрации результатов, минимальная концентрация МЦ-LR, достоверно выявляемая в бутилированной питьевой воде с помощью тест-системы (пороговая чувствительность), составляла 0,1 нг/мл для разных партий тест-систем. При концентрации МЦ-LR 1,0 нг/мл тестовая полоса уже не выявлялась. При анализе питьевой воды разных производителей, а также питьевой водопроводной воды, получали сходные результаты. Пороговая чувствительность тест-системы при анализе речной и озерной воды составляла не более 0,5 нг/мл. Предел обнаружения МЦ-LR с использованием разработанной тест-системы оказался в несколько раз ниже установленного ВОЗ ПДК для МЦ-LR в питьевой воде (1 нг/мл) и рекреационной воде (10 нг/мл) [18, 19] и установленного Роспотребнадзором ПДК для питьевой и рекреационной воды (1 нг/мл) [20]. При анализе тканей рыб на содержание МЦ-LR пороговая чувствительность составляла не более 3 нг/г ткани. Результаты анализа тканей карпа, белого амура и толстолобика были сопоставимы. С использованием шкалы интерпретации результатов, которая вкладывается в каждую тест-систему, при визуальном учете результатов можно проводить полуколичественное определение содержания МЦ-LR в исследуемых образ-

цах в диапазоне концентраций 0,1–0,4 нг/мл для питьевой воды, 0,5–2,0 нг/мл для пресной воды открытых водоемов и 3–10 нг/г для тканей рыб.

При инструментальном учете результатов анализа, минимальные выявляемые концентрации МЦ-LR в образцах были примерно в 2–3 раза ниже, в сравнении с визуальным способом учета результатов (рис. 4, см. на вклейке). Инструментальная пороговая чувствительность разработанной тест-системы составляла не более 0,04–0,05 нг/мл для питьевой воды, не более 0,2–0,3 нг/мл для воды открытых водоемов и 1,0–2,0 нг/г при анализе тканей рыб для разных партий тест-системы (рис. 4, см. на вклейке). С использованием инструментального метода учета результатов можно проводить полуколичественное определение содержания МЦ-LR в исследуемых образцах с достаточной точностью.

Кроме МЦ-LR, с помощью разработанной тест-системы с различной эффективностью выявлялись различные виды МЦ (см. таблицу). МЦ-LR[D-Asp3], МЦ-RR, МЦ-HtyR, и МЦ-YR детектировались с высокой эффективностью. Средний уровень реактивности тест-системы обнаружился с МЦ-WR, МЦ-RR[D-Asp3] и нодуларин.

Тест-полоски демонстрировали высокую повторяемость интенсивности окрашивания тестовой линии и линии сравнения, а также повторяемость получаемых результатов (рис. 5, см. на вклейке).

Хранение тест-полосок в упакованном виде с силикагелем в течение 12 мес при температуре 4 °С или в течение 6 мес при комнатной температуре не снижало эффективности выявления разных видов МЦ и нодуларина.

Обсуждение

Микроцистины, продуцируемые токсигенными цианобактериями, представляют существенную угрозу жизни и здоровью человека и животных [1–8], в связи с чем создание средств экспресс-выявления токсинов группы микроцистинов является актуальной задачей. Иммунохроматографические методы выявления различных соединений сочетают в себе простоту, скорость проведения анализа, достаточно высокую чувствительность и специфичность, что делает их привлекательными для экспресс-выявления МЦ. К настоящему времени разработан ряд иммунохроматографических методов выявления МЦ [22–28]. Разработанные методы основаны на использовании частиц коллоидного золота, флуоресцентных маркеров, ферментов. Применяется

как визуальный, так и инструментальный способ регистрации результатов. При использовании визуальной фиксации результатов, минимальная выявляемая концентрация МЦ с использованием описанных методов составляет 0,1–1 нг/мл [22–28]. Применение инструментальных методов учета результатов, особенно при использовании флуоресцентных меток, позволяет повысить пороговую чувствительность до 0,03 нг/мл.

Разработанная и производимая ФГУП «НЦ "Сигнал"» тест-система для экспресс-определения МЦ в воде и пресноводной рыбе основана на прямом конкурентном иммунохроматографическом анализе. Все иммунореагенты высушены на тест-полоске и проведение анализа заключается в погружении части тест-полоски в исследуемый образец и регистрации результатов через 20 мин путем сравнения интенсивностей окрашивания тестовой линии и линии сравнения. При визуальном способе фиксации результатов, минимальная концентрация наиболее распространенного и наиболее токсичного МЦ-LR, достоверно выявляемая в питьевой воде с помощью тест-системы, составляла не более 0,1 нг/мл, в воде открытых водоёмов – не более 0,5 нг/мл, что существенно ниже установленного ВОЗ ПДК для МЦ-LR в питьевой (1 нг/мл) и рекреационной (10 нг/мл) воде и установленного Роспотребнадзором ПДК для питьевой и рекреационной воды (1 нг/мл) [18–20]. Пороговая чувствительность тест-системы при определении МЦ-LR в тканях рыб составляла не более 3 нг/г ткани. При инструментальном (ридерном) учёте результатов анализа минимальные детектируемые концентрации МЦ-LR в пробах были в 2–3 раза ниже, в сравнении с визуальным способом учета результатов. Пороговая чувствительность разработанной тест-системы при выявлении МЦ-LR была сопоставима с поро-

говой чувствительностью лучших вариантов, разработанных ранее иммунохроматографических методов выявления МЦ [22–28]. С использованием шкалы интерпретации результатов при визуальном способе учета результатов или с использованием инструментального метода учета результатов можно проводить полуколичественное определение содержания МЦ в исследуемых образцах. С помощью разработанной тест-системы с различной эффективностью обнаруживались различные виды МЦ, в том числе наиболее токсичные: МЦ-LR[D-Asp3], МЦ-RR, МЦ-HtyR и МЦ-YR выявлялись с эффективностью, сопоставимой с эффективностью выявления МЦ-LR (60–100%). Средний уровень реактивности (20–40%) наблюдался при анализе МЦ-WR, МЦ-RR[D-Asp3] и нодуларина. Следует отметить, что ряд видов МЦ (например, МЦ-LW) не выявлялись с помощью разработанной тест-системы.

Заключение

Разработана иммунохроматографическая тест-система для обнаружения и полуколичественного определения микроцистинов в питьевой воде, воде открытых водоёмов и пресноводной рыбе. При визуальном и инструментальном способе фиксации результатов минимальная концентрация МЦ-LR, достоверно выявляемая в питьевой воде и воде открытых водоёмов с помощью тест-системы, была существенно ниже ПДК, установленного ВОЗ и Роспотребнадзором для МЦ-LR для питьевой и рекреационной воды. С помощью разработанной тест-системы с различной эффективностью обнаруживались различные виды МЦ, а также нодуларин. Разработанная тест-система может быть использована для мониторинга содержания микроцистинов и нодуларина в питьевой воде, воде открытых водоёмов и тканях рыб.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1, 3–5, 7–9, 11, 17–19, 21, 23–30 см. в References)

- Волошко Л.Н., Плющ А.В., Титова Н.Н. Токсины цианобактерий (Cyanobacteria, Суапорхута). *Альгология*. 2008; 18(1): 3–20.
- Румянцев В.А., Крюков Л.Н., Поздняков Ш.Р., Жуковский А.В. Цианобактериальное «цветение» воды – источник проблем природопользования и стимул инноваций в России. *Общество. Среда. Развитие*. 2011; 2: 222–8.
- Пряхин Е.А., Тряпицина Г.А., Ячменев В.А., Бурмистрова А.Л., Андреев С.С., Сафонова Е.В. и др. Оценка токсических свойств цианобактерий Шершеневского водохранилища Челябинской области. *Гигиена и санитария*. 2008; 1: 73–5.
- Тихонова И.В., Белых О.И., Помазкина Г.В., Гладких А.С. Анализ цианобактерий озера Байкал и Усть-Илимского водохранилища на наличие гена синтеза микроцистина. *Доклады АН*. 2006; 409(3): 425–7.
- Тихонова И.В., Гладких А.С., Белых О.И., Сороковикова Е.Г. Выявление потенциально токсичных цианобактерий в озере Байкал и водохранилищах Иркутской области с помощью полимеразной цепной реакции. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2006; 2: 202–5.
- Белых О.И., Тихонова И.В., Сороковикова Е.Г., Гладких А.С., Калужная О.В. Выявление токсичных *Microcystis* в озере Котокельское (Бурятия). *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2009; 330: 172–5.
- Никаноров А.М., Хоружая Т.А., Минаева Л.И., Мартышева Н.А. Опасность «цветения» Цимлянского водохранилища. *Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение*. 2011; 38(28): 70–4.
- Белых О.И., Гладких А.С., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Потапов С.А., Федорова Г.А. Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в водоемах России, Беларуси и Украины. *Химия в интересах устойчивого развития*. 2013; 21: 363–78.
- Санитарные правила и нормы (СанПиН 1.2.3685–21). «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания» от 28 января 2021 г.
- Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографические тест-системы для детекции микроцистина-LR в морепродуктах. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021; 57(3): 303–10. <https://doi.org/10.31857/S055510992103017X>

REFERENCES

- Butler N., Carlisle J.C., Linville R., Washburn B. *Microcystins: A brief overview of their toxicity and effects, with special reference to fish, wildlife, and livestock*. CA.: California Environmental Protection Agency. OEHHA Ecotoxicology; 2009.
- Voloshko L.N., Plyushch A.V., Titova N.N. Cyanobacteria toxins (Cyanobacteria, Cyanophyta). *Algologiya*. 2008; 18(1): 3–20 (in Russian)
- Carmichael W.W. *The cyanotoxins. Advances in Botanical Research*. 1997; 27: 211–56. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60282-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60282-7)
- Sivonen K., Borner T. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: Herrero A., Flores E., eds. *The Cyanobacteria Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008: 158–97. <https://doi.org/10.21775/9781910190432>
- Ibelings B.W., Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: a review. *Environ. Pollut.* 2007; 150: 177–92.
- Rumyansev V.A., Kryukov L.N., Pozdnyakov S.H.R., Zhukovskij A.V. Cyanobacterial “blooming” of water is a source of environmental management problems and a stimulus for innovation in Russia. *Obshchestvo. Sreda. Razvitie*. 2011; 2: 222–28. (in Russian)
- Landsberg J.H. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Reviews in Fisheries Science*. 2002; 10 (2): 113–390. <https://doi.org/10.1080/20026491051695>
- Stewart I., Seawright A.A., Shaw G.R. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008; 619: 613–37. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_28
- Zhou L., Yu H., Chen K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed. Environ. Sci.* 2002; 15(2): 166–71.
- Pryahin E.A., Tryapicina G.A., Yachmenev V.A., Burmistrova A.L., Andreev S.S., Safonova E.V., et al. Assessment of the toxic properties of cyanobacteria in the Shershnevsky reservoir, Chelyabinsk region. *Gigiena i sanitariya*. 2008; 1: 73–5 (in Russian)
- Voloshko L., Kopecky J., Safronova T., Pljuscha A., Titova N., Hrouzek P., Drabkova V. Toxins and other bioactive compounds produced by cyanobacteria in Lake Ladoga. *Estonian J. Ecol.* 2008; 57(2): 100–10. <https://doi.org/10.3176/eco.2008.2.02>
- Tihonova I.V., Belyh O.I., Pomazkina G.V., Gladkih A.S. *Analysis of cyanobacteria from Lake Baikal and the Ust-Ilimsk reservoir for the presence of the microcystin synthesis gene. Doklady AN [Analiz cianobakterij ozera Bajkal i Ust-Ilimskogo vodoxranilishha na nalichie gena sinteza mikrotsistina. Doklady AN.]*. 2006; 409(3): 425–7. (in Russian)
- Tihonova I.V., Gladkih A.S., Belyh O.I., Sorokovikova E.G. Identification of potentially toxic cyanobacteria in Lake Baikal and reservoirs of the Irkutsk region using polymerase chain reaction. *Byulleten' VSNK SO RAMN*. 2006; 2: 202–25. (in Russian)
- Belyh O.I., Tihonova I.V., Sorokovikova E.G., Gladkih A.S., Kalyuzhnaya O.V. Detection of toxic *Microcystis* in Lake Kotokelskoe (Buryatia). *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*. 2009; 330: 172–5. (in Russian)
- Nikanorov A.M., Horuzhaya T.A., Minina L.I., Martysheva N.A. The danger of “blooming” of the Tsimlyansk reservoir. *Vodoochistka. Vodopodgotovka. Vodospabzhenie*. 2011; 38(28): 70–4. (in Russian)
- Belyh O.I., Gladkih A.S., Sorokovikova E.G., Tihonova I.V., Potapov S.A., Fedorova G.A. Microcystin-producing cyanobacteria in water bodies of Russia, Belarus and Ukraine. *Khimiya v interesah ustojchivogo razvitiya*. 2013; 21: 363–78. (in Russian)
- Fastner J., Humpage A. *Hepatotoxic cyclic peptides – microcystins and nodularins*. In: Chorus I., Welker M., eds. *Toxic Cyanobacteria in Water*. FL.: CRC Press; 2021: 21–52.
- Chorus I., Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London and N.Y.: E & FN Spon; 1999.
- World Health Organization. *Guidelines for Drinking Water Quality. In: Health Criteria and Other Supporting Information*. World Health Organization. 2nd ed. Geneva: 1998; 2: 95–110.
- Sanitary rules and regulations (SanPiN 1.2.3685–21). “Hygienic standards and requirements for ensuring the safety and (or) harmlessness of environmental factors to humans” dated January 28, 2021 [Sanitarny'e pravila i normy] (SanPiN 1.2.3685–21). “Gigienicheskie faktory sredy obitaniya” ot 28 yanvarya 2021 g.]. (in Russian)
- Testai E., Buratti F.M., Funari E., Manganello M., Vichi S., Arnich A., Biré R., Fessard V., Sialehaamo A. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. *EFSA Supporting Publications*. 2016; 13(2): 998E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-998>
- Zvereva E.A., Gendrikson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic test systems for the detection of microcystin-LR in seafood. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2021; 57(3): 303–10. <https://doi.org/10.31857/S055510992103017X> (in Russian)
- Liu L., Xing C., Yan H., Kuang H., Xu C. Development of an ELISA and Immunochromatographic Strip for Highly Sensitive Detection of Microcystin-LR. *Sensors*. 2014; 14(8): 14672–85. <https://doi.org/10.3390/s140814672>
- Pyo D., Choi J., Hong J., Oo H.H. Rapid analytical detection of microcystins using gold colloidal immunochromatographic strip. *J. Immunoassay Immunochem*. 2006; 27(4): 291–302. <https://doi.org/10.1080/15321810600862355>
- Sun J., Li Y., Pi F., Ji J., Zhang Y., Sun X. Using fluorescence immunochromatographic test strips based on quantum dots for the rapid and sensitive determination of microcystin-LR. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017; 409(8): 2213–2220. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0166-9>
- Tippkötter N., Stückmann H., Kroll S., Winkelmann G., Noack U., Scheper T., Ulber R. A semi-quantitative dipstick assay for microcystin. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009; 394(3): 863–9. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2750-8>
- Xing C., Liu L., Song S., Feng M., Kuang H., Xu C. Ultrasensitive immunochromatographic assay for the simultaneous detection of five chemicals in drinking water. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 66: 445–53. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2047-0>
- Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic tests for the detection of microcystin-LR toxin in water and fish samples. *Anal. Methods*. 2020; 12: 392–400. <https://doi.org/10.1039/C9AY01970G>
- Chu F.S., Huang X., Wei R.D., Carmichael W.W. Production and characterization of antibodies against microcystins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; 55: 1928–33. <https://doi.org/10.1128/aem.55.8.1928-1933.1989>
- Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution. *Nat. Phys. Sci.* 1973; 241: 20–2.

ОБ АВТОРАХ:

Синьгов Евгений Константинович, кандидат мед. наук, начальник научно-исследовательской группы, ФГУП «НЦ “Сигнал”», 107014, Москва, Российская Федерация. E-mail: 9652291422@list.ru

Моренков Олег Сергеевич, доктор биол. наук, директор Института биофизики клетки ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Московская область, Пушкино, Российская Федерация. E-mail: morenkov_o@mail.ru

Сипин Сергей Валерьевич, старший научный сотрудник НИГ ФГУП «НЦ “Сигнал”», 107014, Москва, Российская Федерация. E-mail: reepper@mail.ru

Врублевская Вероника Валерьевна, ведущий научный сотрудник Института биофизики клетки ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Московская область, Пушкино, Российская Федерация. E-mail: v_vrublevskaya@mail.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Evgeny K. Singov, Candidate of Medical Sciences, Head of the Research Group, FSUE NC Signal, 107014, Moscow, Russian Federation. <https://orcid.org/0009-0001-3977-4455> E-mail: 9652291422@list.ru

Oleg S. Morenkov, Doctor of Biological Sciences, Director of the Institute of Cell Biophysics of the Pushchinsky Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, 142290, Moscow Region, Pushchino, Russian Federation. <https://orcid.org/0000-0001-9614-5236> E-mail: morenkov_o@mail.ru

Sergey V. Sipin, Senior Researcher at NIG FSUE NC Signal, 107014, Moscow, Russian Federation. <https://orcid.org/0009-0008-0027-6994> E-mail: reepper@mail.ru

Veronika V. Vrublevskaya, Senior Researcher at the Institute of Cell Biophysics of the Pushchinsky Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, 142290, Moscow Region, Pushchino, Russian Federation. <https://orcid.org/0000-0002-0993-7356> E-mail: v_vrublevskaya@mail.ru



*К статье Е.К. Синьгова и соавт.
To the article by Evgeny K. Singov et al.*

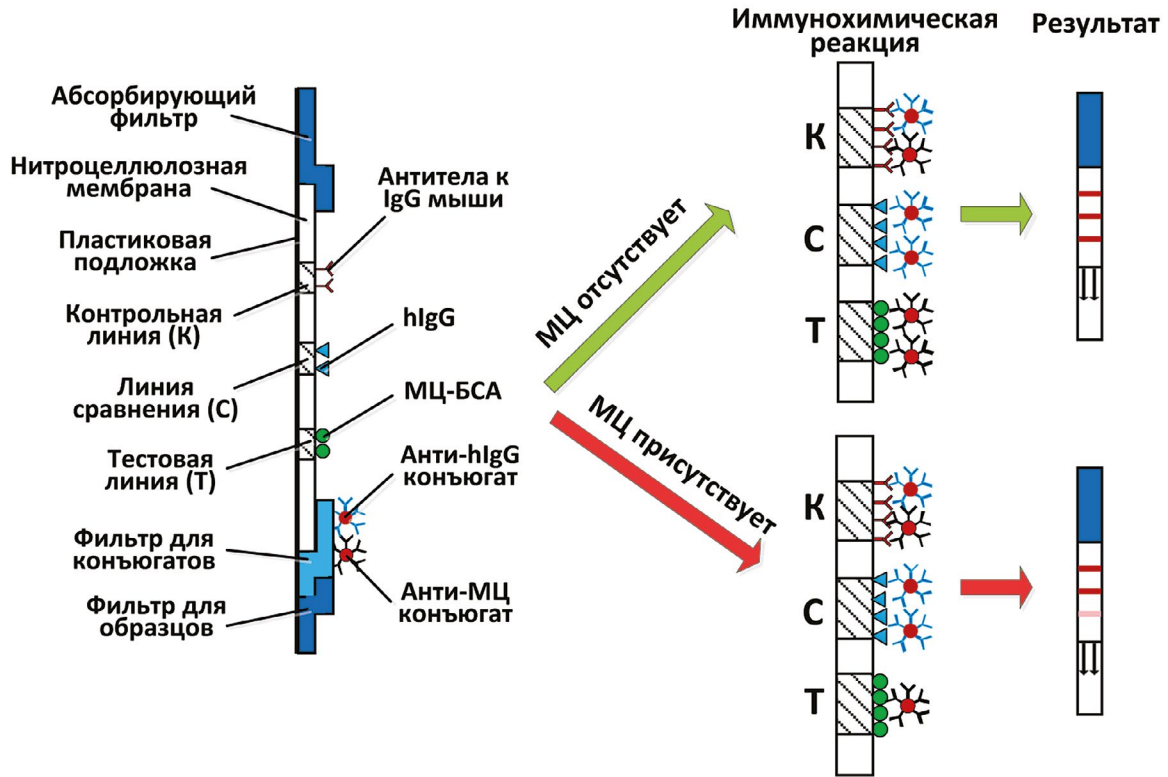


Рис. 2. Конструкция тест-полоски и схема проведения анализа.
Fig. 2. Design of the test strip and scheme of analysis.

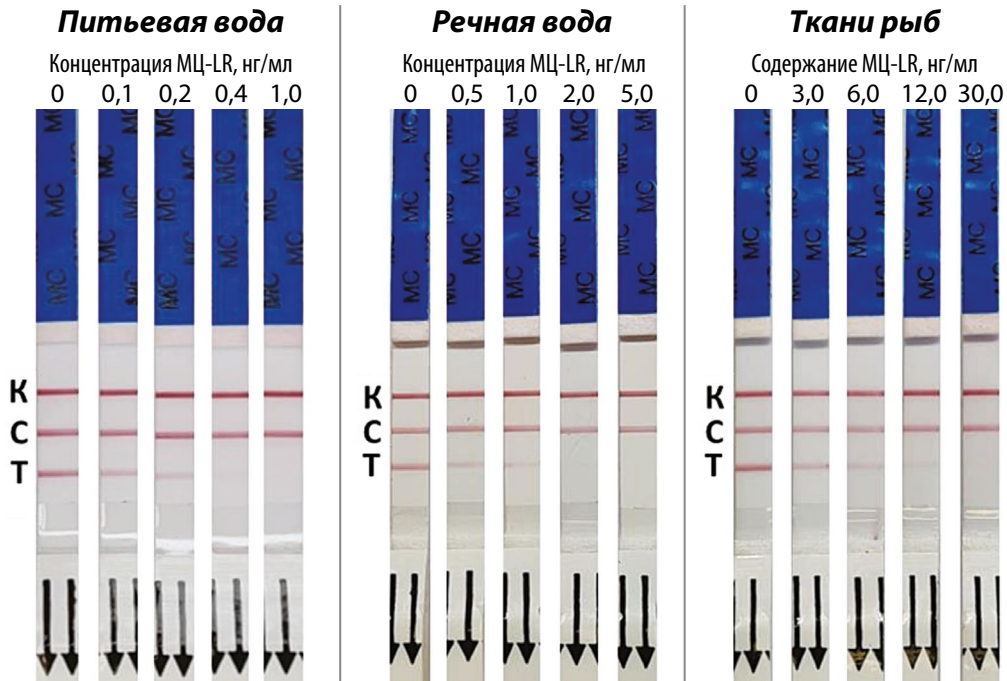


Рис. 3. Определение содержания МЦ-LR в питьевой воде, речной воде и тканях рыб с использованием визуальной регистрации результатов.
Fig. 3. Determination of MC-LR content in drinking water, river water and fish tissues using visual recording of the results.

*К статье Е.К. Синьгова и соавт.
To the article by Evgeny K. Singov et al.*

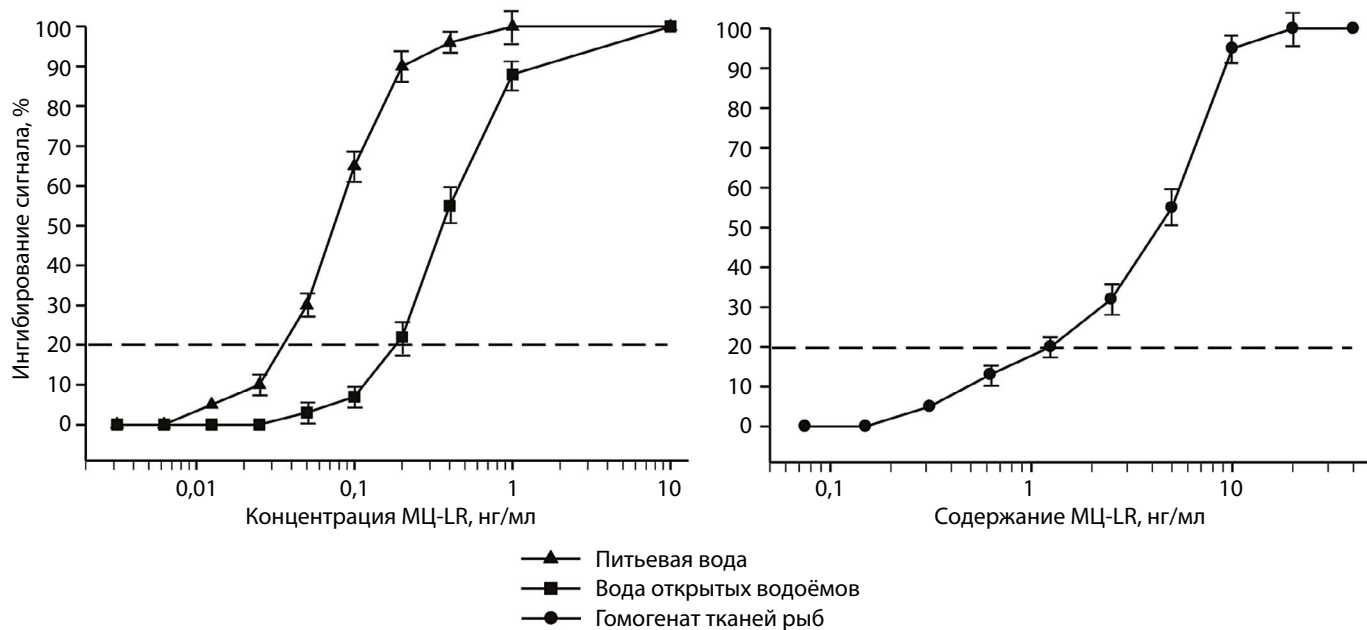


Рис. 4. Определение содержания МЦ-LR в питьевой и речной воде, а также в тканях рыб с использованием инструментального способа учета результатов анализа. 20% ингибирования интенсивности окрашивания тестовой линии относительно линии сравнения считали значением, дискриминирующим положительные и отрицательные образцы

Fig. 4. Determination of the content of MC-LR in drinking and river water, as well as in fish tissues using an instrumental method of recording the results. A 20% inhibition of the staining intensity of the test line relative to the reference line was considered to be the cut-off value discriminating between positive and negative samples.

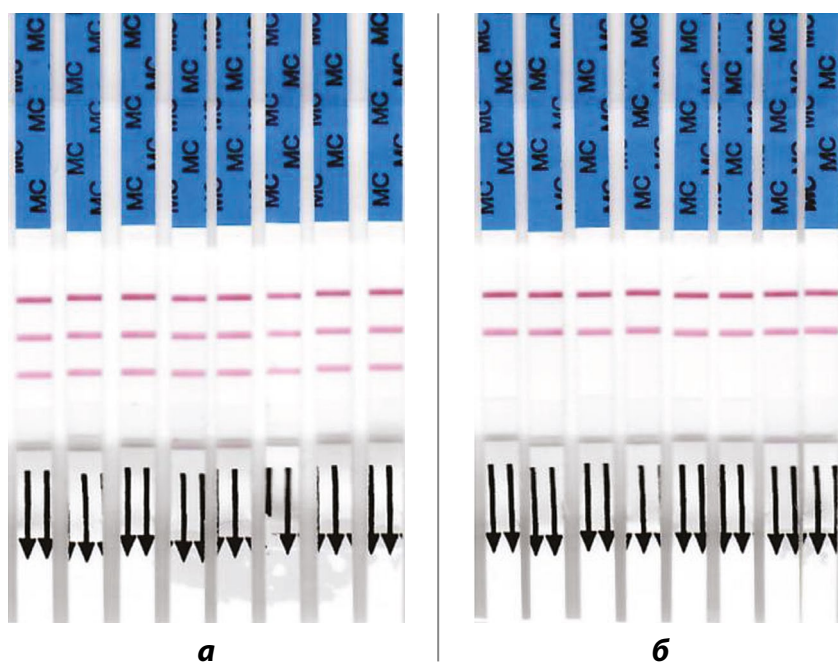


Рис. 5. Повторяемость результатов анализа питьевой воды: а – МЦ-LR отсутствует; б – МЦ-LR присутствует в концентрации 1 нг/мл (установленная ВОЗ ПДК для МЦ-LR в питьевой воде).

Fig. 5. Repeatability of results of drinking water analysis: а – MC-LR is absent; б – MC-LR is present at a concentration of 1 ng/mL (WHO MPC established for MC-LR in drinking water).