

УДК 57.083.3; 577.112; 615.07

ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ПРИМЕРЕ АНАЛИЗА КАРДИОМАРКЕРОВ

И.П. Андреева¹, Е.А. Яковлева¹, В.Г. Григоренко¹, А.П. Осипов^{1,2*}

(¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; ²Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; e-mail: aposipov@mail.ru)

Разработана иммунохроматографическая тест-система для совместного одновременного анализа двух кардиомаркеров: белка, связывающего жирные кислоты (с-БСЖК) и тропонина I (ТнI) в сыворотке и цельной крови. Изучены основные этапы создания мультипараметрической тест-системы: влияние положения антител и размера наночастиц золота на результаты. Пределы обнаружения метода составили 10 нг/мл для с-БСЖК и 1 нг/мл для ТнI, коэффициент вариации результатов анализа не превышал 10%. С помощью разработанной тест-системы был подтвержден диагноз острого инфаркта миокарда (N = 9). Время анализа составляет 15 мин.

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ, белок, связывающий жирные кислоты, тропонин I, острый инфаркт миокарда.

В течение последнего десятилетия в мировой аналитической практике интенсивно развиваются иммунохимические методы экспресс-анализа различных важных биологически активных соединений с визуальной регистрацией результатов. В настоящее время наиболее распространен иммунохроматографический анализ (ИХА) [1–3]. Метод основан на использовании мембранных носителей, содержащих все необходимые для анализа компоненты в готовом виде. Дешевые, быстрые и простые аналитические технологии на основе иммунохроматографии позволяют проводить высокочувствительные качественные измерения без специальных навыков и оборудования в домашних, лабораторных и полевых условиях. К преимуществам ИХА относится возможность определять в рамках одного анализа сразу несколько аналитов. Мультипараметрические тест-системы были разработаны для определения токсинов, пестицидов, антибиотиков и других соединений в пищевых продуктах [4–7], онкомаркеров в крови [8], специфических иммуноглобулинов E для диагностики аллергических заболеваний [9] и др.

Одновременный экспресс-анализ сразу нескольких маркеров представляет большой интерес в кардиологии для диагностики различных сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе острого инфаркта миокарда (ОИМ), поскольку в настоящее время ни один из известных методов не гарантирует надежной диагностики ОИМ,

особенно на ранней стадии болезни. В качестве биохимических маркеров повреждения миокарда наиболее предпочтительны тропонины вследствие их абсолютной кардиоспецифичности. При повреждении миокарда повышенная концентрация тропонина в крови обнаруживается через 3–4 ч (пик приходится на 3–4 сутки) и остается повышенной до 7–10 дней [10]. Вследствие этого для ранней диагностики ОИМ наряду с исследованиями тропонинов рекомендуется определять ранние миокардиальные маркеры.

В качестве перспективного биохимического маркера ранней диагностики ОИМ был предложен белок, связывающий жирные кислоты из сердца человека (с-БСЖК). При повреждении миокарда концентрация с-БСЖК в крови значительно повышается в течение 3 ч после появления симптомов ОИМ и возвращается к нормальному уровню через 12–24 ч [11]. Кроме того, с-БСЖК обладает более высокой тканеспецифичностью по сравнению с миоглобином.

Показано, что одновременное определение с-БСЖК и тропонина I позволяет достоверно диагностировать инфаркт миокарда, при этом в первые часы заболевания чувствительность диагностики инфаркта миокарда существенно повышается по сравнению с определением только ТнI [12, 13].

В последние годы были разработаны простые качественные тесты для определения с-БСЖК и ТнI в крови, основанные на методах иммунох-

роматографии. Пределы обнаружения этих тестов варьируются от 7 до 15 нг/мл для с-БСЖК [14-16] и от 0,3 до 2 нг/мл для ТнI [17]. Также разработаны иммунохроматографические тест-системы для одновременного определения ТнI в сочетании с миоглобином и/или изоформой креатинфосфокиназы (КФК-МВ) [18, 19].

Ранее в нашей лаборатории были разработаны индивидуальные иммунохроматографические тест-системы для определения с-БСЖК и ТнI [20, 21]. Были подобраны оптимальные пары моноклональных антител, иммобилизованных на фазе и меченных наночастицами золота (НЧЗ), которые обеспечивают максимальную чувствительность анализа определяемых антигенов. В качестве визуальной метки использовали наночастицы золота.

Цель настоящей работы заключалась в изучении основных этапов создания иммунохроматографической тест-системы для одновременного совместного визуального определения нескольких анализов на примере таких кардиомаркеров, как с-БСЖК и тропонин I, чувствительность определения которых различается на порядок.

Экспериментальная часть

В работе использованы биохимические и химические реагенты, бычий сывороточный альбумин (БСА), цитрат натрия, рН-полоски с диапазоном определения 4,5–10 фирмы «Sigma» (США); золотохлористоводородная кислота (ЗХВК) фирмы «Fluka» (Швейцария). Моноклональные антитела, специфичные к ТнI: IC-19, I-18, I-60; моноклональные антитела к с-БСЖК: F9 и F10, ТнI («Биалекса», Россия); с-БСЖК, антивидовые антитела овцы против IgG мыши (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия).

В мультимембранных тест-полосках для иммунохроматографии использованы следующие мембраны фирмы «MDI» (Индия): аналитические нитроцеллюлозные мембраны CNPC (размер пор 15 м) и 150-CNPH-N; мембрана для нанесения конъюгата PT-R5; абсорбирующая мембрана AP045; мембраны для нанесения образца GFB-R7L, FR1(0,6), FR1(0,35), FR2, WFR1.

Образцы сывороток крови были предоставлены ЗАО «НВО Иммунотех». Определение концентрации с-БСЖК в сыворотках крови проводили методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) [22]. Определение концентрации ТнI в сыворотках крови проводили с помощью набора для иммуноферментного анализа «Tropoin-ELISA» («Biomerica», США), согласно инструкции производителя.

Все растворы готовили на деионизованной воде Milli-Q («Millipore», Франция). Использовали следующие буферные растворы: 0,01 М К-фосфатный, рН 7,0 (ФБ); 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, рН 7,5 (ФБС); 0,01 М К-фосфатный, 0,15 М NaCl, 0,1% твин 20, рН 7,4 (ФБСТ). Стандартные растворы с-БСЖК и ТнI для анализа готовили на сыворотке или цельной крови, не содержащей исследуемые аналиты или с очень низким их содержанием.

Получение наночастиц коллоидного золота

Растворы коллоидного золота с заданным размером частиц получали методом восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия, как описано ранее [23]. К 100 мл кипящего 1%-го раствора золотохлористоводородной кислоты при перемешивании добавляли 2; 1,6 и 1,2 мл 1%-го водного раствора цитрата натрия. Раствор кипятили еще 15 мин при перемешивании. Средний размер полученных наночастиц золота составил 15, 25 и 35 нм по данным сканирующей электронной микроскопии.

Получение конъюгата наночастиц золота с антителами

Конъюгаты наночастиц золота с моноклональными антителами F9 и IC-19, специфичными соответственно к с-БСЖК и ТнI, получали отдельно в соответствии с методиками, описанными в [20, 21]. К 10 мл раствора коллоидного золота с рН 7,0–7,5 добавляли по каплям при перемешивании 1 мл раствора антител с выбранной концентрацией (0,22 мг/мл в деионизованной воде), перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли раствор БСА (до 0,2%), сахарозу (до 10%) и раствор азида натрия (до 0,01%). Полученные растворы конъюгатов центрифугировали (30 мин, 11000g, +4 °С). Супернатант удаляли, осадок суспендировали в требуемом объеме ФБ, содержащего 0,1% БСА, 10% сахарозы и 0,01% азида натрия.

Далее полученные растворы конъюгатов смешивали в соотношении 1:1, наносили пипетированием на стекловолоконные мембраны PT-R5 (260×5 мм) и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Изготовление иммунохроматографической тест-полоски

На аналитическую нитроцеллюлозную мембрану, наклеенную на пластиковую подложку (260×75 мм), наносили раствор моноклональных антител F10 (0,5 мг/мл в ФБС), специфичных к

с-БСЖК; на расстоянии 5 мм от них наносили смесь моноклональных антител I-60 и I-18 (3:1), специфичных к ТнI, с общей концентрацией 1 мг/мл в ФБС для формирования аналитической зоны. Для формирования контрольной зоны иммунохроматографической системы на расстоянии 5 мм от аналитической зоны наносили раствор аффинно очищенных антивидовых антител овцы против мыши с концентрацией 1 мг/мл. Антитела наносили с помощью программируемого автоматического диспенсера «BioDot XYZ 3050» («BioJet Quanti 3000», «BioDot», США), имеющего насос со следующими параметрами: размер капли 30 нл, шаг 0,3 мм, скорость 50 мм/с. Высушивание полосок проводили в термощкафу в течение 24 ч при +37 °С.

Собирали тест-кассеты (260×75 мм) в соответствии со схемой, представленной на рис. 1 и резали на полоски шириной по 4 мм с помощью резка гильотинового типа «Index Cutter-I» («A-Point Technologies», США).

Проведение иммунохроматографического анализа

На нижний край тест-полоски наносили 30 мкл раствора анализируемого образца или стандартного раствора, приготовленного на сыворотке или цельной крови, а затем помещали тест-полоски в лунки полистиролового планшета со 120 мкл ФБСТ. Через 15 мин тест-полоски доставали, помещали на горизонтальную поверхность, визуально оценивали результат и высушивали.

Для количественной оценки результатов анализа тест-полоски после проведения анализа ска-

нировали («Epson Perfection V700 Photo», «Seiko-Epson», Япония). Полученные изображения в виде графических файлов (TIF, RGB, 24 bits, 600 dpi) обрабатывали с помощью программы Scion Image для Windows, определяли интенсивность (I , усл. ед.) окраски полос в аналитической зоне и строили градуировочные графики зависимости интенсивности полос от концентрации аналита в анализируемом растворе.

Предел обнаружения (нг/мл) определяли как минимальную концентрацию с-БСЖК или ТнI, которую можно достоверно зарегистрировать визуально.

Результаты и обсуждение

Основная цель работы заключалась в объединении двух ранее разработанных тест-систем в один формат, т.е. в создании иммунохроматографической тест-системы для совместного одновременного определения раннего кардиомаркера с-БСЖК и более позднего ТнI, что дает возможность увеличить эффективность диагностики ОИМ.

Принципиальная схема иммунохроматографической тест-системы для определения с-БСЖК и тропонина I представлена на рис. 1. По мере продвижения образца крови, содержащего с-БСЖК и/или ТнI, вдоль мембраны в тестовой зоне происходит образование иммунокомплексов антигенов со специфическими антителами, сорбированных на поверхности коллоидных частиц золота и иммобилизованных на аналитической мембране, что приводит к появлению окрашенных полос. В отсутствие

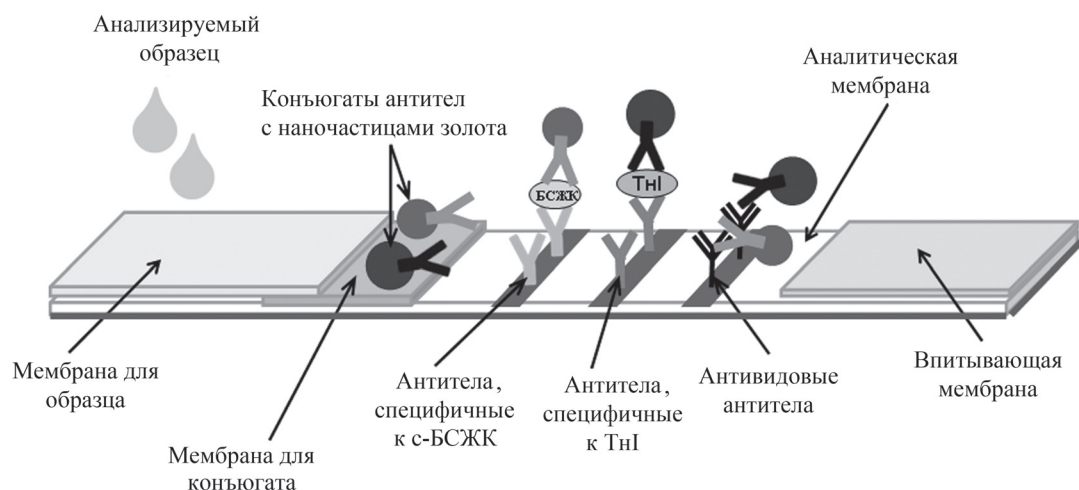


Рис. 1. Схема иммунохроматографической тест-системы

исследуемых антигенов в образце проявляется только одна контрольная линия.

На основе результатов, полученных ранее, в настоящей работе для с-БСЖК была использована пара моноклональных антител F10, иммобилизованных на мембране, и F9, меченных наночастицами золота диаметром 15 нм [20]. При анализе тропонина I для иммобилизации на аналитической мембране была выбрана комбинация антител IC-60 и I-18, специфичных к разным эпитопам (центральному и концевому соответственно) молекулы ТнI [21], а конъюгат наночастиц золота (35 нм) был получен с антителами IC-19, специфичными к центральному участку ТнI.

Выбор схемы анализа

Рассмотрены два варианта тест-систем, отличающихся последовательностью нанесения на мембрану антител, специфичных к с-БСЖК и ТнI.

В а р и а н т 1. Первыми на аналитической мембране иммобилизованы антитела к с-БСЖК, затем на расстоянии 5 мм от них иммобилизованы антитела к ТнI, далее вторичные антитела, представляющие собой контрольную зону;

В а р и а н т 2. Первыми иммобилизованы антитела к ТнI, далее иммобилизованы антитела к с-БСЖК, а затем вторичные антитела.

Сравнение двух вариантов тест-систем показало, что положение антител на мембране существенно влияет на чувствительность анализа ТнI. Она значительно уменьшалась при проведении анализа на тест-полосках с последовательностью антител в варианте 2 (рис. 2). В случае с-БСЖК кривые практически совпадали на начальном участке.

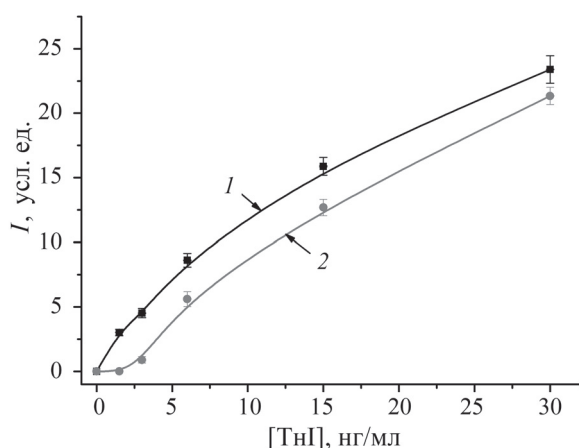


Рис. 2. Градуировочные графики для определения тропонина I, полученные для двух вариантов расположения антител на мембране

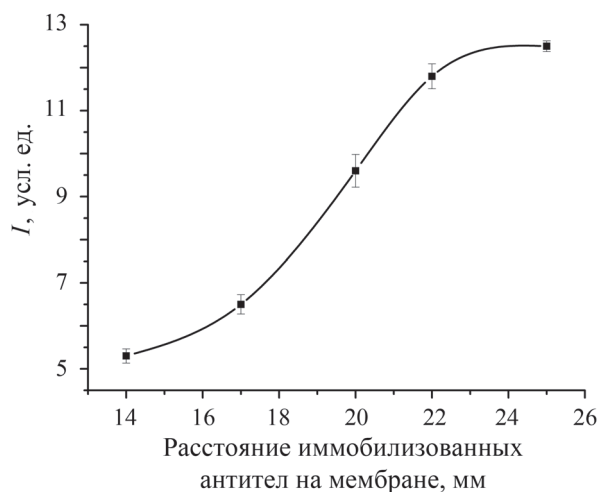


Рис. 3. Зависимость аналитического сигнала от расстояния иммобилизованных на мембране антител при концентрации ТнI 10 нг/мл

В связи с этим было изучено влияние расстояния, на котором были иммобилизованы на мембране антитела, специфичные к ТнI, на кинетику образования в аналитической зоне тест-полоски тройного окрашенного комплекса (рис. 3). Показано, что с увеличением расстояния иммобилизованных антител с 14 до 22 мм от начала аналитической зоны наблюдается увеличение аналитического сигнала в два раза. Это можно объяснить тем, что ТнI требуется больше времени как на связывание с мечеными антителами, так и для образования тройного комплекса с антителами, иммобилизованными на мембране. Дальнейшее увеличение расстояния (до 25 мм) не приводит к значительным изменениям. Таким образом, для работы были использованы тест-полоски, на аналитической части которых последовательно нанесены антитела к с-БСЖК, далее антитела к ТнI и антивидовые антитела, что соответствует положению антител в варианте 1.

Выбор размера наночастиц золота

Для упрощения и стандартизации процедуры получения конъюгатов антител к с-БСЖК и ТнI было предложено использовать НЧЗ одного размера (25 нм). Сравнение результатов анализа показало, что при использовании НЧЗ одинакового размера наблюдается низкий аналитический сигнал при анализе ТнI, чувствительность определения уменьшается в 5 раз (данные не показаны). При этом в системе с-БСЖК увеличение размера НЧЗ приводит к появлению фонового сигнала. Это свидетельствует о наличии неспецифических взаимодействий при отсутствии с-БСЖК в анализируемом растворе, что крайне важно при визу-

альной оценке результатов анализа. Это согласуется с литературными данными [23, 24], где было показано возрастание величины коэффициента экстинкции растворов НЧЗ с увеличением размера частиц. В дальнейшем конъюгаты антител к с-БСЖК и ТнI получали с НЧЗ разного диаметра (15 и 35 нм для с-БСЖК и ТнI соответственно), а затем смешивали их в равных пропорциях.

Выбор мембран для проведения анализа

В данной работе, основываясь на ранее полученных результатах [20, 21], рассмотрены два вида нитроцеллюлозных мембран (150-N-CNPH и CNPC, 15μ), отличающихся между собой по сорбционной емкости, скорости протекания жидкости и связывающей способности. Для этих мембран изучена зависимость интенсивности аналитического сигнала от времени проведения анализа (рис. 4). Для мембраны CNPC, характеризующейся самой высокой скоростью протекания жидкости (по данным производителя, время протекания 4 см составляет 100 с), интенсивность аналитического сигнала через 10 мин после начала анализа в два раза превышала аналогичный показатель для мембраны 150-N-CNPH (150 с/4 см). Для дальнейших экспериментов была выбрана мембрана CNPC, так как при схожих с 150-N-CNPH значениях аналитического сигнала мембрана CNPC обеспечивала меньшее время проведения анализа, что важно для экспресс-диагностики.

Одна из задач настоящей работы заключалась в создании тест-системы для экспресс-определения с-БСЖК и ТнI как в сыворотке/плазме крови, так и в цельной крови. Это позволило бы легко и

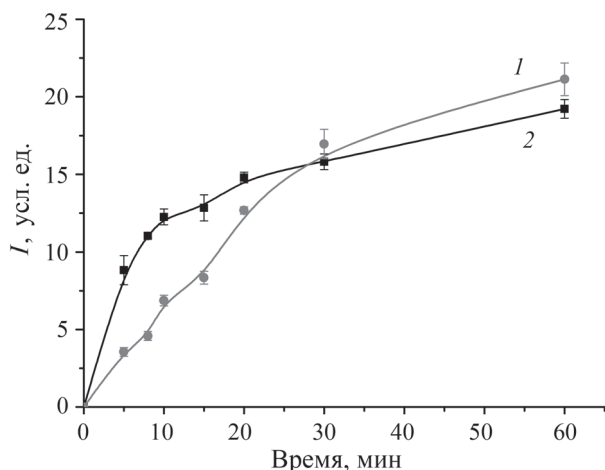


Рис. 4. Зависимость интенсивности аналитического сигнала от времени анализа для мембран: 1 – 150-N-CNPH; 2 – CNPC (15μ) при концентрации с-БСЖК 50 нг/мл

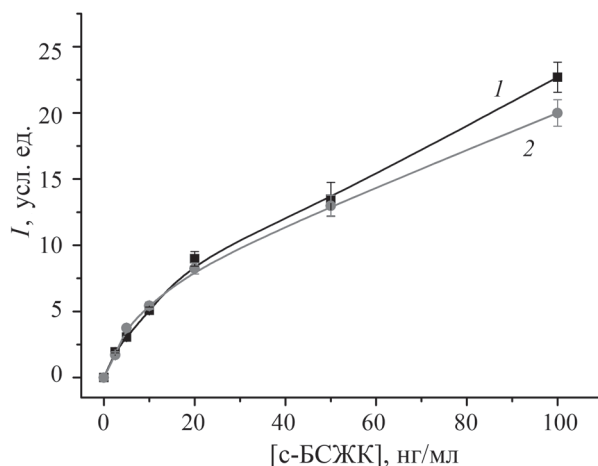


Рис. 5. Градуировочные графики, полученные с использованием мембраны FR1(0,6) для стандартных растворов с-БСЖК, приготовленных: 1 – в сыворотке крови, 2 – в цельной крови

быстро проводить анализ не только в лабораторных условиях, но и в условиях скорой помощи, в отделениях кардиореанимации. Разработанная ранее методика для определения с-БСЖК и ТнI в сыворотке крови человека включала предварительное разбавление образцов в пять раз буферным раствором [20, 21], что в рутинной практике, как правило, приводит к увеличению времени анализа и ошибке эксперимента.

Для проведения анализа в цельной крови человека необходимо подобрать мембрану для нанесения образца, применение которой не требует разбавления образцов буферным раствором, обеспечивает фильтрацию клеток крови и хорошее протекание образца по тест-полоске. Выбранные ранее мембраны (GFB-R7L для с-БСЖК и MAPDS-0300 для ТнI [20, 21]) оказались непригодными для определения аналитов в цельной крови, так как они не предназначены для фильтрации клеток крови.

Изучено несколько видов целлюлозных мембран, предназначенных для фильтрации клеток крови, отличающихся структурой, толщиной и способом применения – FR1(0,35), FR1(0,6), FR2(0,35), FR2(0,7), WFR1. Из всех представленных образцов только мембраны FR1(0,6) и FR1(0,35) хорошо отделяли красные кровяные клетки от плазмы и не пропускали их на аналитическую часть. Однако при использовании мембраны FR1(0,35) скорость протекания образца оказалась значительно ниже. Градуировочные графики, полученные для стандартных растворов с-БСЖК, приготовленных в сыворотке крови и в цельной крови, не содержащей с-БСЖК, с ис-

пользованием мембраны FR1(0,6) незначительно отличались друг от друга, и на результаты анализа это не оказывало существенного влияния (рис. 5). Аналогичные результаты были получены и для ТнI. В качестве оптимального был выбран объем образца крови 30 мкл.

Таким образом, была разработана иммунохроматографическая тест-система для одновременного определения с-БСЖК и ТнI в сыворотке и цельной крови человека. При визуальной детекции результатов через 15 мин предел обнаружения метода для с-БСЖК составил 10 нг/мл, что соответствует верхней границе нормы определения с-БСЖК и полностью удовлетворяет задачам диагностики ОИМ [11, 12]. Предел обнаружения для ТнI составил 1,0 нг/мл, что сравнимо с пределом обнаружения уже существующих тест-систем для определения ТнI [17, 19].

Метод характеризуется хорошей воспроизводимостью результатов: относительное стандартное отклонение ($N = 5$) для образцов сыворотки крови с разной концентрацией аналитов составляет 3,5–5,8% для с-БСЖК и 5,3–9,2% для ТнI. Тест-система стабильна в течение 12 месяцев при хранении при +4 °С и может быть использована для быстрого качественного определения уровня с-БСЖК и ТнI в клинической практике. Время проведения анализа составляет 15 мин.

Определение с-БСЖК и ТнI в образцах сыворотки крови

Разработанная тест-система была апробирована с использованием образцов сыворотки крови, отобранных в разное время после наступления инфаркта. Образцы были взяты у 9 пациентов с подтвержденным диагнозом ОИМ. Кровь отбирали в момент поступления в больницу и далее

через 6–12 ч в течение 3–7 суток (таблица). Диагноз ОИМ поставлен клинически, а затем подтвержден методами иммуноферментного анализа для определения с-БСЖК [22] и ТнI («Tropoin-I-ELISA», «Biomerica», США).

У шести из девяти пациентов отмечалось повышенное содержание с-БСЖК уже при поступлении в больницу, а через 6 ч это наблюдалось у всех пациентов (таблица). К концу вторых суток повышенный уровень с-БСЖК сохранялся только у пяти пациентов. В то время как ТнI был обнаружен только у одного пациента при поступлении в больницу. К концу первых суток (через 18–24 ч после наступления ОИМ) повышенное содержание ТнI было обнаружено во всех образцах. У трех пациентов повышенный уровень ТнI сохранялся до 4 суток, а у одного пациента – до 7 суток. Превышение порогового значения для ТнI (1 нг/мл) наступает позже, чем для с-БСЖК. Все результаты коррелировали с данными, полученными методами ИФА. Таким образом, с помощью разработанной экспресс тест-системы на основе латерального проточного иммуноанализа для определения с-БСЖК и ТнI у всех проанализированных пациентов был подтвержден диагноз острого инфаркта миокарда ($N = 9$). Кроме того чувствительность диагностики при одновременном анализе двух кардиомаркеров была существенно выше в ранний период заболевания.

При анализе образцов сыворотки крови, взятых у здоровых людей ($N = 38$), а также образцов, взятых у пациентов с диагнозом нестабильная стенокардия ($N = 12$), в аналитической части тест-полоски наблюдалась одна контрольная полоса. Это означает, что концентрация с-БСЖК и ТнI в них была ниже пределов обнаружения нашего метода. В случае определения с-БСЖК не было

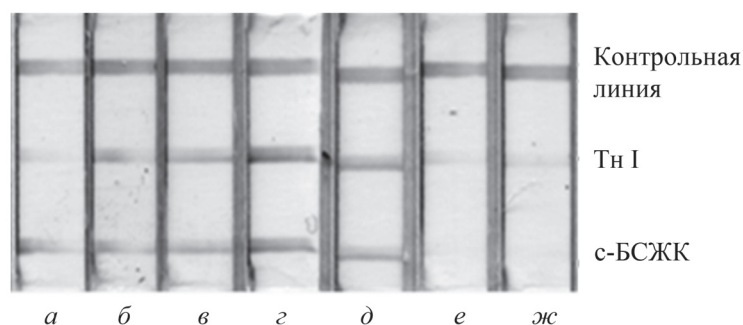


Рис. 6. Результаты определения с-БСЖК и ТнI у одного пациента с диагнозом ОИМ: *а* – при поступлении в больницу, *б* – через 6 ч, *в* – через 18 ч, *г* – через 24 ч, *д* – через 36 ч, *е* – через 48 ч, *ж* – через 3 суток

Результаты определения с-БСЖК и ТнI (с-БСЖК/ТнI) в сыворотке крови пациентов с диагнозом ОИМ с помощью иммунохроматографической тест-системы для одновременного определения кардиомаркеров

Номер образца	Интервал времени, прошедший после поступления пациента								
	При поступлении	часы				сутки			
		6	18	24	48	3	4	5	7
1	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-
2	+/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
3	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+
5	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-
6	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
7	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	н/д	н/д	н/д	н/д
8	+/-	+/-	+/+	-/+	-/+	н/д	н/д	н/д	н/д
9	+/-	+/-	+/+	+/+	+/+	н/д	н/д	н/д	н/д

Обозначения: «-» – отрицательный результат (отсутствие окрашенной полосы в тестовой линии); «+» – положительный результат (наличие окрашенной полосы в тестовой линии); н/д – нет данных.

выявлено ни ложноположительных, ни ложноотрицательных результатов, что свидетельствует об удовлетворительной специфичности данного теста.

На рис. 6 представлены результаты определения с-БСЖК (внизу) и ТнI (вверху) в динамике пациента 4 в течение 3 суток с момента поступления в больницу.

Разработанная тест-система для одновременного определения с-БСЖК и ТнI может использоваться в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений кардиологического профиля, а также во внелaborаторных условиях

при оказании экстренной медицинской помощи для подтверждения или опровержения диагноза ОИМ на ранних и более поздних стадиях заболевания.

Работа выполнена в соответствии с госзаданием Минобрнауки «Организация проведения научных исследований», соглашение №16.6548.2017/ВУ.

Конфликта интересов нет.

Дополнительной информации нет.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- Rosen S. Lateral flow immunoassay, ed. R.C. Wong, H.Y. Tse. N.Y., 2009. P. 35.
- Posthuma-Trumpie G., Korf J., van Amerongen A. // Anal. Bioanal. Chem. 2009. Vol. 393. P. 569.
- Huang X., Aguilar Z.P., Xu H., Lai W., Xiong Y. // Biosensors and Bioelectronics. 2016. Vol. 75. P. 166.
- Song S., Liu N., Zhao Z., Ediage E.N., Wu S., Sun C., De Saeger S., Wu A. // Anal. Chem. 2014. Vol. 86. P. 4995 (DOI: 10.1021/ac500540z).
- Wang L., Cai J., Wang Y., Fang Q., Wang S., Cheng Q., Du D., Lin Y., Liu F. // Microchim. Acta. 2014. Vol. 181. P. 1565.
- Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Biosens. Bioelectron. 2015. Vol. 63. P. 255.
- Xing C., Liu L., Song S., Feng M., Kuang H., Xu C. // Biosens. Bioelectron. 2015. Vol. 66. P. 445 (DOI: 10.1016/j.bios.2014.12.004).
- Wang C., Hou F., Ma Y. // Biosens. Bioelectron. 2015. Vol. 68. P. 156 (DOI: 10.1016/j.bios.2014.12.051).
- Chinnasamy T., Segerink L.I., Nystrand M., Gantelius J., Svahn H.A. // Analyst. 2014. Vol. 139. P. 2348.
- Babuín L., Jaffe A.S. // CMAJ. 2005. Vol. 173. P. 1191.
- Lescuyer P., Allard L., Hochstrasser D.F., Sanchez J-C. // Mol. Diagn. 2005. Vol. 9. P. 1.
- Lippi G., Mattiuzzi C., Cervellini G. // Clin. Biochem. 2013. Vol. 46. P. 26.
- Abbasi W.A., Saleem M., Rasheed S., Kiyani A.M. // J. Ayub Med. Coll. 2017. Vol. 29. P. 107.
- Liang Y., Chan C., Cheung K., Catherley G., Renneberg R. // J. Immunoassay Immunochem. 2011. Vol. 32. P. 342.
- Li C.J., Li J.Q., Liang X.F., Li X.X., Cui J.G., Yang Z.J., Guo Q., Cao K.J., Huang J. // Acta Pharmacol. Sin. 2010. Vol. 31. P. 307.

16. Зырянова А.В., Ярошно Н.Н., Николаев К.Ю. // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2010. Vol. 4. С. 46.
17. Ramparany L., Ramirez J., Nizou J., Le Saux D., Richard V., Talarmin A. // Clin. Vaccine Immunol. 2011. Vol. 18. P. 414.
18. Zhu J., Zou N., Zhu D., Wang J., Jin Q., Zhao J., Mao H. // Clin. Chem. 2011. Vol. 57. P. 1732.
19. URL: [http://www.rapidtest.com/pdf/3_in_1_Troponin_I_CK-MB_Myoglobin_Serum_WB_166779-1\(8-21-2012\).pdf](http://www.rapidtest.com/pdf/3_in_1_Troponin_I_CK-MB_Myoglobin_Serum_WB_166779-1(8-21-2012).pdf)
20. Yakovleva E.A., Andreeva I.P., Grigorenko V.G., Osipov A.P. // Moscow University Chemistry Bulletin. 2011. Vol. 66. P. 356 (DOI: 10.3103/S0027131411060101).
21. Yakovleva E.A., Andreeva I.P., Grigorenko V.G., Egorov A.M., Osipov A.P. // Moscow University Chemistry Bulletin. 2012. Vol. 67. P. 249 (DOI: 10.3103/S0027131412060107).
22. Grigorenko V., Andreeva I., Borchers T., Spener F., Egorov A. // Anal. Chem. 2001. Vol. 73. P. 1134.
23. Andreeva I.P., Grigorenko V.G., Egorov A.M., Osipov A.P. // Anal. Letters. 2016. Vol. 49. P. 579.
24. Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2007. Vol. 58. P. 3.

Поступила в редакцию 10.01.2019
 Получена после доработки 12.02.2019
 принята к публикации 14.02.2019

PECULIARITIES OF THE DEVELOPMENT OF A MULTIPARAMETRIC IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEM BASED ON THE ANALYSIS OF CARDIOMARKERS

I.P. Andreeva¹, E.A. Yakovleva¹, V.G. Grigorenko¹, A.P. Osipov^{1,2}

(¹Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Enzymology Division; ²National University of Science and Technology "MISIS"; e-mail: aposipov@mail.ru)

An immunochromatographic test system was developed for the simultaneous analysis of two cardiomarkers: heart type fatty acid binding protein (h-FABP) and troponin I (TnI) in serum and whole blood. The main stages of creating a multiparameter test system were reported: the effect of the position of antibodies and the size of gold nanoparticles, influencing the results of the analysis. The limits of detection of the method were 10 ng/ml for h-FABP and 1 ng/ml for TnI; the coefficient of variation of the results of the analysis did not exceed 10%. Using the developed test system, the diagnosis of acute myocardial infarction (N = 9) was confirmed. The analysis time was 15 minutes.

Key words: immunochromatographic assay; human heart fatty acid binding protein; human troponin-I; acute myocardial infarction.

Сведения об авторах: Андреева Ирина Петровна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (imtek@newmail.ru); Яковлева Елена Алексеевна – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (yakovlevahelena@gmail.com); Григоренко Виталий Георгиевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.com); Осипов Александр Павлович – ст. науч. сотр. кафедры функциональных наносистем и высокотемпературных материалов Национального исследовательского технологического университета (НИТУ «МИСиС»), доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (aposipov@mail.ru).