



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENTIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01044**

(22) Data de depozit: **02.11.2010**

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. **6/2012**

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• BADEA DONI MIHAELA,
BD. CAMIL RESSU NR.4, BL.5, SC.C,
AP.115, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• CHIVULESCU IOAN ALEXANDRU,
STR.ROMULUS NICULESCU BAZAR
NR.40, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• OCNARU EMILIA, STR. 9 MAI NR.1,
BL.25, SC.1, ET.8, AP.34, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) SISTEM ȘI METODĂ DE IMUNOANALIZĂ ÎN FLUX PENTRU DETERMINARE DE MICOTOXINE

(57) Rezumat:

Prezenta inventie se referă la un sistem și o metodă de imunoanaliză în flux, pentru determinare de micotoxine. Conform inventiei, sistemul de imunoanaliză este format dintr-o pompă peristaltică multicanal (P), un flux purtător (a) în care se injectează, prin intermediu unei valve (I), un amestec preincubat, format din proba de analizat, un antigen marcat cu peroxidază și un anticorp specific, o minicolană (PG) încărcată cu un suport insolubil, pe care este immobilizată proteina G, un flux de soluție de apă oxigenată (b), un flux de soluție de luminol (c), o celulă de analiză în flux (FC) și un tub fotomultiplicator (PMT) operat de un computer (PC). Metodade analiză conform inventiei se bazează pe incubarea off-line a probei conținând micotoxina, cu cantități precise de anticorp specific și de antigen marcat, până la atingerea echilibrului, în amestecul având loc o competiție a antigenilor pentru anticorp; amestecul se injectează în sistemul de imunoanaliză în flux, astfel încât trece prin microcolană cu proteina G, unde este reținută întreaga cantitate de anticorp sub formă de

complex, iar forma liberă a antigenului marcat este eluată și cuantificată prin evaluarea activității enzimaticе a peroxidazei pe baza reacției de chemiluminescență, mărimea semnalului fiind proporțională cu concentrația antigenului din probă.

Revendicări: 2
Figuri: 3

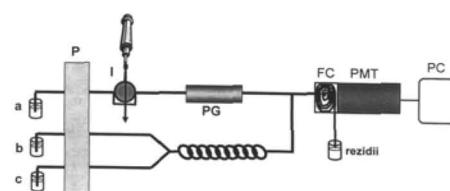


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



SISTEM SI METODA DE IMUNOANALIZA IN FLUX PENTRU DETERMINARE DE MICOTOXINE

Invenția se referă la o metodă și un sistem de imunoanaliză pentru determinarea unor molecule mici de tipul micotoxinelor, în probe lichide, folosind principiul injectării în flux și a detecției prin chemiluminescență.

Micotoxinele sunt metaboliți secundari, extrem de toxici produși de o gamă foarte largă de fungi filamentoși (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) care infesteză o serie de produse vegetale cum ar fi cerealele, fructele, oleaginoasele, cafeaua, condimentele, atât în timpul cultivării, cât și al conservării acestora. Proprietățile toxice ale micotoxinelor la oameni și animale includ efecte neurotoxice, hepatotoxice, cancerigene, imunosupresive și estrogenice. Dintre cele câteva sute de micotoxine identificate până în prezent, aflatoxinele, ochratoxina A, tricotecenele, zearalenona, fumonizinele și patulina sunt cu precădere monitorizate în produsele alimentare și în furaje datorită răspândirii și efectelor lor toxice.

Deoarece limitele maxime admise ale micotoxinelor se situează în domeniul zecilor de ppt (ng/L) pentru unele aflatoxine sau în domeniul ppb (μg/L) pentru Ochratoxina A și patulina, detecția micotoxinelor necesită sisteme de analiză extrem de sensibile. Au fost dezvoltate metode și kit-uri rapide de screening a micotoxinelor bazate pe metode imunochimice de tipul ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) competitivă. Ca metode confirmatorii au fost dezvoltate diverse metode cromatografice de tipul HPLC cu detector de fluorescență, GC cu detector cu captură de electroni, GS/MS și LC/MS. Pentru acestea au fost stabilite o serie de protocoale de clean-up a probelor pentru îndepărțarea matricei și / sau concentrarea micotoxinelor analizate.

Metodele ELISA și cele cromatografice sunt sensibile, dar prezintă și câteva dezavantaje: necesită echipamente și kit-uri de analiză scumpe; sunt mari consumatoare de timp datorită timpului de incubare și / sau a etapelor de clean-up; nu sunt adecvate determinărilor direct pe teren.

Pentru determinarea sensibilă și rapidă a unor molecule mici cum sunt cele ale micotoxinelor, ca o alternativă la metodele cromatografice și ELISA, au fost dezvoltate câteva sisteme de imunoanaliză bazate pe principiul analizei în flux. Imunoanaliza prin injectare în flux (FIIA – Flow injection immunoassay) combină imunoanaliza cu tehnica analizei prin injectare în flux (FIA – Flow injection analysis). FIA este o metodă în flux continuu bazată pe introducerea



unui volum precis de probă într-un flux purtator nesegmentat. Proba, în drumul ei către celula de analiză a detectorului, poate fi supusă în flux unor diverse operații: diluare, filtrare, separare, treceri prin microcoloane cu reactivi imobilizați, amestecare cu reactivi, etc.

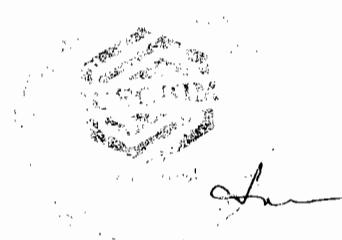
Brevetul US 7087389 descrie un sistem de imunoanaliză în flux cu detecție vizuală aplicat la determinarea rapidă a Aflatoxinei B1. Sistemul este bazat pe utilizarea unei membrane microporoase cu anticorp imobilizat și a unui suport adsorbant de unică folosință.

Se cunoaște un alt tip de sistem de imunoanaliză în flux pentru determinarea Aflatoxinei M1 din lapte neprocesat (M. Badea, L. Micheli, M.C Messia, T. Candigliota, E. Marconi, T. Mottram, M. Velasco-Garcia, D.. Moscone, G. Palleschi, "Aflatoxin M1 determination in raw milk using a flow injection immunoassay system", Anal. Chim. Acta 520, 2004, p. 141 – 148). Acest sistem este prevăzut cu detecție electrochimică, fapt care îngreunează extinderea acestuia la determinarea altor micotoxine prezente în probe alimentare lichide de tipul vin, bere, sucuri datorită prezenței unui număr mare de interferenții electrochimici.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui sistem de imunoanaliză prin injectare în flux cu detecție chemiluminometrică și dezvoltarea unei metode pentru determinarea sensibilă a micotoxinelor din probe lichide complexe cu un minim de pregătire a acestora. Detecția chemiluminometrică prezintă urmatoarele avantaje: sensibilitate și selectivitate deosebite date de reacția de chemiluminescență; nu este influențată de prezența unor compuși electrochimic activi (comparativ cu metodele cu detecție electrochimică); se pot analiza și probe colorate (spre deosebire de metodele cu detecție spectrofotometrică).

Sistemul de imunoanaliza în flux conform invenției este format dintr-o pompa peristaltică multicanal (**P**), un flux purtător (**a**) în care se injectează prin intermediul unei valve de injectare (**I**) un amestec pre-incubat format din proba de analizat, antigen marcat cu peroxidaza și anticorp specific, o minicolanoană (**PG**) împachetată cu Proteina G imobilizată pe un suport insolubil, un flux de soluție de apă oxigenată (**b**), un flux de soluție de luminol (**c**), o celulă de analiză în flux (**FC**) și un tub fotomultiplicator (**PMT**) cuplat la un computer (**PC**).

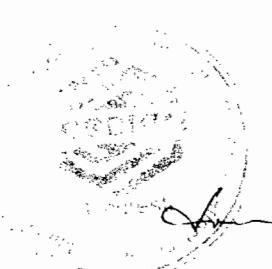
În figura 1 este reprezentat schematic sistemul de imunoanaliză în flux cu detecție electrochimică. Tuburile pompei peristaltice sunt din tygon și au diametrul interior de 0,7...1,8mm. Curgerea soluțiilor se realizează prin tuburi de PTFE cu diametrul între 0,2 și 0,8 mm. Valva de injectare **I** este o valvă rotativă cu 6 căi, realizată din inox și este prevăzută cu un septum special ce permite injectarea unor volume mici de ordinul 5...25 µL cu ajutorul unei



seringi de sticlă tip Hamilton. Valva este acționată manual pe pozițiile încărcare – injectare. Microcoloana **PG** este realizată din PTFE sau sticlă, are diametrul interior de 2...5 mm și lungimea de 10...50mm. Coloana este împachetată cu proteină G imobilizată pe un suport insolubil de agaroză reticulată cu o capacitate de legare de cel puțin 35 mg IgG / mL suport, după care se închide la cele două capete cu frite din PTFE cu porozitatea de 100 μm . Coloana este inserată în sistemul de imunoanaliză prin intermediul unor conectori adecuați. Celula de analiză în flux este formată dintr-un tub de PTFE cu lungimea de 50 cm dispus în formă de spirală și atașat de o suprafață reflectorizantă tip oglindă pentru amplificarea luminii emise. Celula de analiză în flux este montată în mod etanș în fața ferestrei circulare a tubului fotomultiplicator pentru a împiedica pierderile de lumină emisă, precum și pătrunderea luminii din exterior. Se utilizează un tub fotomultiplicator Hamamatsu (Japonia) cu un diametru al ferestrei active de 25 mm. Operarea tubului fotomultiplicator se realizează prin simpla cuplare a acestuia la un PC și accesarea software-ului aferent. Potențialul aplicat tubului fotomultiplicator este de 800...1000 V, iar intensitatea radiației emise este înregistrată de asemenea prin intermediul softului specific tubului fotomultiplicator.

Fluxul purtător **a** este constituit dintr-o soluție tampon de Hepes 10...100mM cu pH 7...8 ce conține Tween și MgCl_2 . Fluxul **b** este format dintr-o soluție proaspătă de apă oxigenată 10...25 mM preparată în apă bidistilată. Fluxul **c** este constituit din luminol 0,2...1 mM preparat în tampon Hepes cu pH 7....9.5. Debitul fiecărui flux în parte este de 0,05...0,2 mL/min.

Metoda de analiză conform invenției se bazează pe incubarea offline a probei ce conține micotoxina de analizat (antigenul, **Ag**) cu cantități cunoscute și precise de anticorp specific (**Ab**) și de antigen marcat cu peroxidaza (**Ag***) până la atingerea echilibrului, în acest amestec având loc o competiție între antigen și antigenul marcat pentru anticorp. Prin intermediul valvei de injectare **I**, se introduce în sistemul de analiză un flux un volum de 5...25 μL din amestecul preincubat astfel încât să treacă prin minicolanoa în care este imobilizată proteina G. În coloană va fi reținută întreaga cantitate de anticorp aflat sub formă de complex antigen-anticorp (**AgAb**) și antigen marcat – anticorp (**Ag*Ab**) datorită afinității extrem de mari a proteinei G pentru regiunea constantă (**Fc**) a imunoglobulinelor. Din coloană va fi eluată numai forma nelegată de anticorp a antigenului. Forma liberă a antigenului marcat eluat este cuantificată prin evaluarea în flux a activității enzimaticice a peroxidazei pe baza reacției de chemiluminescență cu luminol și



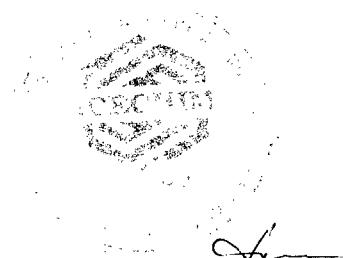
apă oxigenată. Mărimea semnalului de chemiluminescență este proporțională cu concentrația antigenului din probă.

Nu este necesară regenerarea coloanei cu proteină G după fiecare probă, aceasta putând fi utilizată pentru 30 – 80 determinări succesive, în funcție de cantitatea de anticorp folosită.

Pregătirea probei pentru analiză presupune două etape: filtrare și diluare cu o soluție ce are aceeași compoziție cu a fluxului purtător.

Sistemul de analiză și metoda pot fi utilizate pentru determinarea oricărei micotoxine pentru care există disponibili anticorpi și conjugate micotoxină – peroxidază. Având în vedere varietatea mare a acestora, atât pentru variantele comerciale, cât și pentru cele generate / sintetizate în laboratoarele proprii, pentru aplicarea metodei de analiză este necesară parcurgerea următoarelor etape:

- I. Selectarea concentrației / diluției de lucru a conjugatului micotoxină – peroxidază (Ag^*). Prin injectarea în sistemul de analiză a acestei soluții se va obține un peak caracteristic analizei prin injectare în flux a cărui înălțime va fi notată S_{Ag^*} (unități arbitrar de luminescență).
- II. Selectarea concentrației / diluției de lucru a anticorpului astfel încât să fie asigurată o competiție între micotoxină și conjugat. Aceasta se realizează prin incubarea offline a unor soluții de conjugat (cu concentrația de lucru selectată) cu anticorpul specific în diverse concentrații. După atingerea echilibrului de formare a complexului Ag^*Ab amestecurile preincubate sunt injectate în sistemul de imunoanaliză și sunt înregistrate semnalele de chemiluminescență corespunzătoare ce vor fi notate S_{Ag^*+Ab} . Reprezentarea grafică a raportului $(S_{Ag^*+Ab} / S_{Ag^*}) \times 100$ în funcție de concentrația / diluția anticorpului este fitată în imunoanaliză folosind o ecuație logistică cu patru parametri. Concentrația / diluția de lucru a anticorpului corespunde unei capacitați de legare a Ag^* de 40 – 60 %.
- III. Realizarea graficului de calibrare pentru micotoxina analizată. Se incubează, până la atingerea echilibrului, cantități diferite de standard de micotoxină cu concentrațiile de lucru de anticorp și conjugat. Soluțiile preincubate se injectează în sistemul de imunoanaliză și se înregistrează semnale de chemiluminescență ce vor fi notate S_{Ag+Ag^*+Ab} . Se reprezintă grafic raportul $(S_{Ag+Ag^*+Ab} / S_{Ag^*}) \times 100$ în funcție de concentrația de micotoxină și se fitează de asemenea conform unei ecuații logistice cu patru parametri.



Pentru exemplificarea realizării invenției în continuare sunt descrise *sistemul și metoda de imunoanaliză în flux pentru determinarea Aflatoxinei B1 (AFB1)*. S-a utilizat sistemul de imunoanaliză cu detecție chemiluminometrică prezentat în fig. 1. Ca reactivi de imunoanaliză s-au utilizat un conjugat comercial de AFB1 marcat cu peroxidază (Ag*) ce provine dintr-un kit ELISA de imunoanaliză pentru AFB1 produs de R-Biopharm (Germania) și un anticorp monoclonal anti-AFB1(Ab) produs de HyTest Ltd (Finlanda). Ca diluție de lucru a Ag* s-a utilizat diluția de 1/50 a conjugatului inițial. Pentru identificarea concentrației optime de anticorp au fost incubate timp de 60...120 minute soluții ale acestuia cu concentrația cuprinsă între 0,005 µg/mL și 10 µg/mL în prezența conjugatului Ag* (diluție de lucru), timp în care a fost atins echilibrul de formare a complexului Ag*Ab. Amestecurile preincubate au fost injectate în sistemul de imunoanaliză în flux și au fost înregistrate semnalele de chemiluminescență corespunzătoare. În fig. 2 este prezentată grafic dependența $(S_{Ag^*+Ab} / S_{Ag^*}) \times 100$ de concentrația anticorpului, pe baza căruia a fost selectată concentrația de lucru a anticorpului de 0,35 µg/mL. Graficul de calibrare pentru AFB1 s-a realizat în condițiile de lucru selectate și este reprezentat în fig. 3. Concentrațiile de AFB1 din probele reale sunt determinate pe baza utilizării ecuației logistice cu patru parametri ce descrie curba de calibrare.



REVENDICĂRI

1. Sistem de imunoanaliză în flux a micotoxinelor din probe lichide cu detecție chemiluminometrică **caracterizat prin aceea că** este realizat dintr-o pompa peristaltică multicanal (P), un flux purtător (a) de soluție tampon de Hepes 10...100mM cu pH 7...8 ce conține Tween și MgCl₂ în care se injectează prin intermediul unei valve de injectare (I) un volum de 5...25 µL de amestec format din proba de analizat, antigen marcat cu peroxidază și anticorp specific pre-incubat timp de 30...120 min, o minicolană (PG) împachetată cu proteină G imobilizată pe un suport insolubil, un flux de soluție de apă oxigenată 10...25 mM (b), un flux de soluție luminol de 0,2...1 mM preparat în tampon Hepes cu pH 7....9.5 (c), o celulă de analiză în flux (FC) și un tub fotomultiplicator (PMT) cuplat la un computer (PC).

2. Metoda de imunoanaliză în flux a micotoxinelor din probe lichide **caracterizată prin aceea că** se realizează prin incubarea offline a probei filtrate și diluate ce conține micotoxina (Ag) cu cantități cunoscute și precise de anticorp specific (Ab) și de antigen marcat cu peroxidaza (Ag*) timp de 30...120 min până la atingerea echilibrului, în acest amestec având loc o competiție între antigen și antigenul marcat pentru anticorp, amestecul este injectat în sistemul de imunoanaliză în flux astfel încât să treacă prin minicolană în care este imobilizată proteina G unde va fi reținută întreaga cantitate de anticorp aflat sub forma de complex antigen-anticorp (AgAb) și antigen marcat – anticorp (Ag*Ab), iar forma libera a antigenului marcat este eluată și cuantificată prin evaluarea activității enzimaticice a peroxidazei pe baza reacției de chemiluminescență cu luminol și apă oxigenată, mărimea semnalului de chemiluminescență fiind proporțională cu concentrația antigenului din probă.



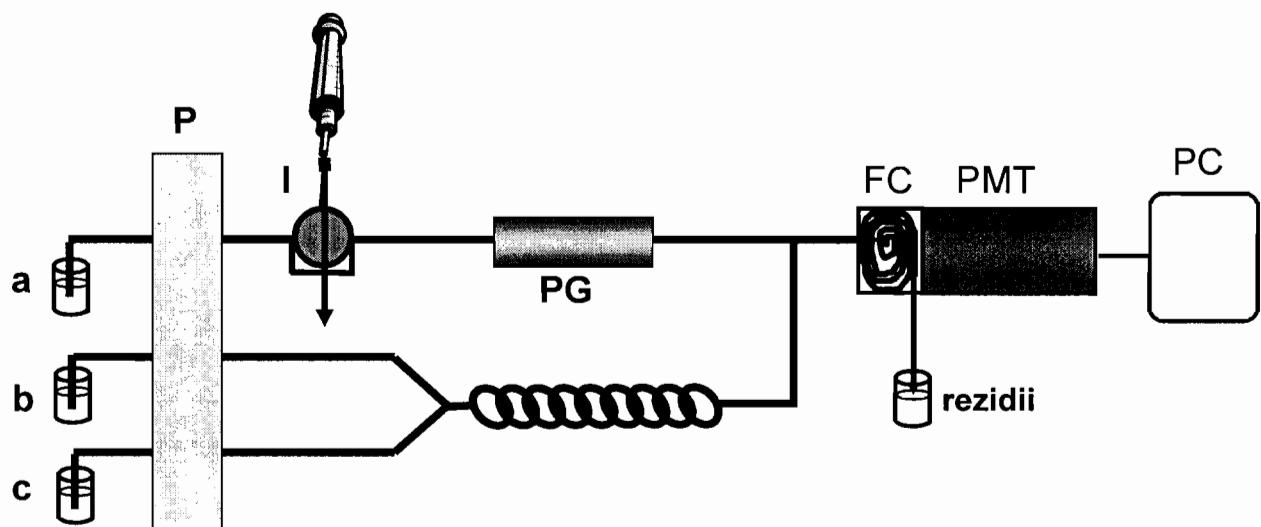


Fig. 1

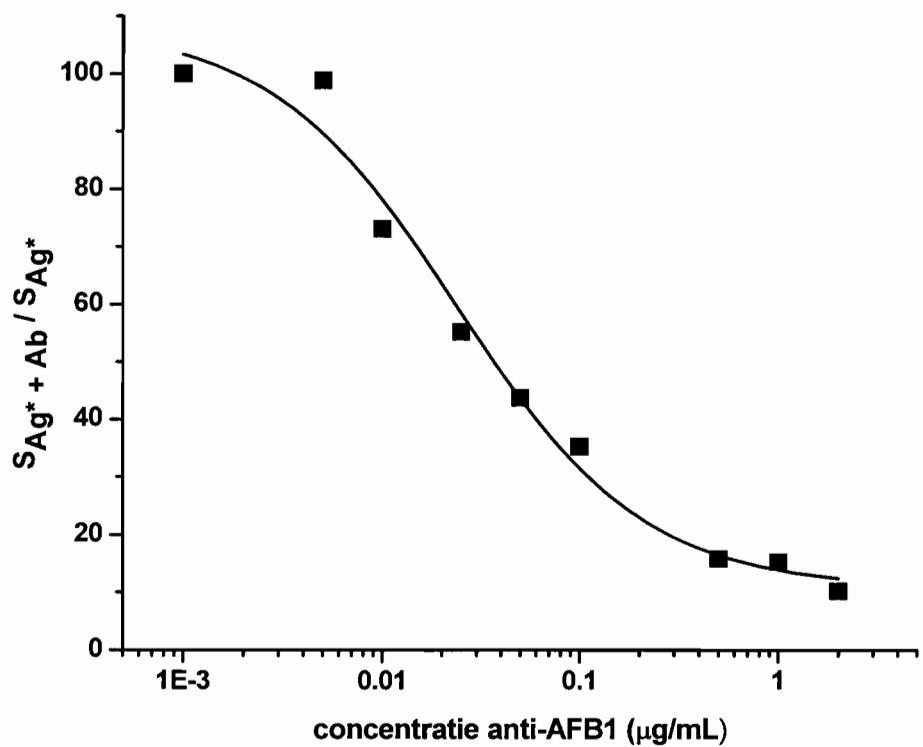


Fig. 2

a-2010-01044

02-11-2010

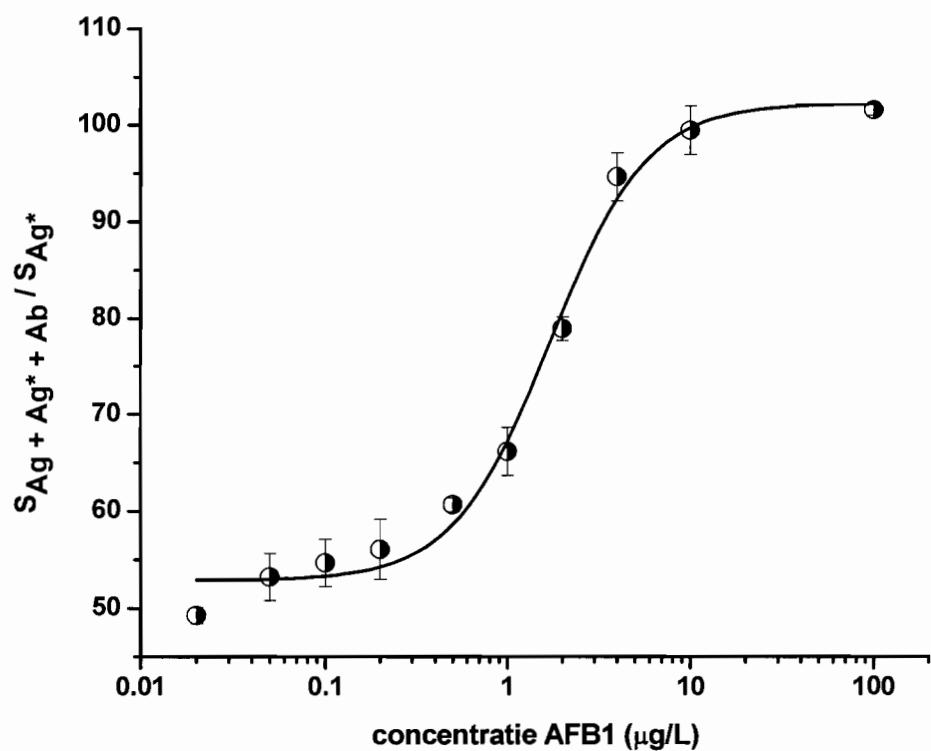


Fig. 3