



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **02/11/2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2016** BOPI nr. **3/2016**

(41) Data publicării cererii:
29/06/2012 BOPI nr. **6/2012**

(73) Titular:
• **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.LT. 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 2002/0110803 A1; 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", ANALYTICA CHIMICA ACTA,
VOL. 520, PP. 141-148, 2004**

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



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

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

12 Deoarece limitele maxime admise ale micotoxinelor se situează în domeniul zecilor
13 de ppt (ng/L) pentru unele aflatoxine, sau în domeniul ppb ($\mu\text{g/L}$) pentru Ochratoxina A și patu-
14 lina, detecția micotoxinelor necesită sisteme de analiză extrem de sensibile. Au fost dezvoltate
15 metode și kit-uri rapide de screening a micotoxinelor, bazate pe metode imunochimice,
16 de tipul ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) competitivă. Ca metode confirmatorii,
17 au fost dezvoltate diverse metode cromatografice, de tipul HPLC cu detector de fluorescență,
18 GC cu detector cu captură de electroni, GS/MS și LC/MS. Pentru acestea au fost stabilite
19 o serie de protocoale de clean-up a probelor pentru îndepărtarea matricei și/sau concentra-
20 rea micotoxinelor analizate.

21 Metodele ELISA și cele cromatografice sunt sensibile, dar prezintă și câteva dez-
22 avantaje: necesită echipamente și kit-uri de analiză scumpe; sunt mari consumatoare de
23 timp, datorită timpului de incubare și/sau etapelor de clean-up; nu sunt adecvate determi-
24 nărilor direct pe teren.

25 Pentru determinarea sensibilă și rapidă a unor molecule mici, cum sunt cele ale mico-
26 toxinelor, ca o alternativă la metodele cromatografice și ELISA, au fost dezvoltate câteva sis-
27 teme de imunoanaliză bazate pe principiul analizei în flux. Imunoanaliza prin injectare în flux
28 (FIIA - Flow injection immunoassay) combină imunoanaliza cu tehnica analizei prin injectare
29 în flux (FIA - Flow injection analysis). FIA este o metodă în flux continuu, bazată pe introdu-
30 cerea unui volum precis de probă într-un flux purtător nesegmentat. Proba, în drumul ei către
31 celula de analiză a detectorului, poate fi supusă în flux unor diverse operații: diluare, filtrare,
32 separare, treceri prin microcoloane cu reactivi imobilizați, amestecare cu reactivi etc.

33 Brevetul **US 7087389** descrie un sistem de imunoanaliză în flux cu detecție vizuală,
34 aplicat la determinarea rapidă a Aflatoxinei B1. Sistemul este bazat pe utilizarea unei mem-
35 brane microporoasă cu anticorp imobilizat, și a unui suport adsorbant de unică folosință.

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

44 **US 2002/0110803 A1** se referă la un dispozitiv analitic simplu, ușor de fabricat,
45 capabil să execute imunoteste de membrană în 3 până la 10 min, în care metoda permite
46 aplicarea de probe concentrate, teste imunologice costisitoare marcate și reactivi de amplifi-
47 care a semnalului.

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*”, *Analytica Chimica Acta* 520 (2004) 141-148, 23 iulie 2004, se referă la o metodă de imunoanaliză prin injectare în flux (FI-IA), cu detectarea amperometrică, pentru determinarea aflatoxinei M1 (AFM1) în lapte.

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.

Metoda de imunoanaliză în flux a micotoxinelor din probe lichide, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se bazează pe incubarea off-line a probei filtrate și diluate, conținând micotoxină (Ag) cu cantități crescute și precise de anticorp specific (Ab) și de antigen marcat cu peroxidază (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 minicoloană, în care este imobilizată proteina G, unde va fi reținută întreaga cantitate de anticorp aflat sub formă de complex antigen-anticorp (AgAb) și antigen marcat-anticorp (Ag*Ab), iar forma liberă a antigenului marcat este eluată și cuantificată prin evaluarea activității enzimatică a peroxidazei, pe baza reacției de chemiluminescență cu luminol și apă oxigenată, mărimea semnalului de chemiluminescență fiind proporțională cu concentrația antigenului din probă.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- sensibilitate și selectivitate deosebite, date de reacția de chemiluminescență;
- nu este influențată de prezența unor compuși electrochimici activi (comparativ cu metodele cu detecție electrochimică);
- se pot analiza și probe colorate (spre deosebire de metodele cu detecție spectrofotometrică).

Sistemul de imunoanaliză în flux, conform invenției, este format dintr-o pompă peristaltică multicanal P, un flux purtător a în care se injectează, prin intermediul unei valve de injectare I, un amestec preincubat, format din proba de analizat, antigen marcat cu peroxidază și anticorp specific, o minicoloană 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 continuare invenția este prezentată prin exemple de realizare în legătură cu cele 3 figuri ce reprezintă:

- fig. 1 - reprezentarea schematică a sistemului de imunoanaliză în flux cu detecție electrochimică;

- fig. 2 - reprezentarea grafică a dependenței $(S_{Ag^*+Ab}/S_{Ag^*}) \times 100$ de concentrația anticorpului, pe baza căruia a fost selectată concentrația de lucru a anticorpului;

- fig. 3 - reprezentarea graficului de calibrare pentru AFB1 care s-a realizat în condițiile de lucru selectate.

În fig. 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...1,8 mm. 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 μ L, 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...50 mm. Coloana este împachetată cu proteină G imobilizată pe

1 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 porozi-
3 tatea de 100 μm. Coloana este inserată în sistemul de imunoanaliză prin intermediul unor
conectori adecvați. Celula de analiză în flux este formată dintr-un tub de PTFE cu lungimea
5 de 50 cm, dispus în formă de spirală, și atașat de o suprafață reflectorizantă, tip oglindă,
7 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,
9 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
11 realizează prin simpla cuplare a acestuia la un PC și accesarea software-ului aferent. Poten-
țialul aplicat tubului fotomultiplicator este de 800... 1000 V, iar intensitatea radiației emise este
înregistrată, de asemenea, prin intermediul softului specific tubului fotomultiplicator.

13 Fluxul purtător **a** este constituit dintr-o soluție tampon de Hepes 10...100 mM, cu pH
7...8 ce conține Tween și MgCl₂. Fluxul **b** este format dintr-o soluție proaspătă de apă oxigenată
15 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.

17 Metoda de analiză conform invenției se bazează pe incubarea off-line a probei ce
conține micotoxina de analizat (antigenul, Ag), cu cantități cunoscute și precise de anticorp
19 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
21 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 minicoloana în care este imobi-
23 lizată 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
25 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
27 eluat este cuantificată prin evaluarea în flux a activității enzimatică a peroxidazei, pe baza
reacției de chemiluminescență cu luminol și apă oxigenată. Mărimea semnalului de chemilu-
29 minescență este proporțională cu concentrația antigenului din probă.

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

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

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

I. selectarea concentrației/diluției de lucru a conjugatului micotoxină-peroxidază (Ag*).
41 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 arbitrare de luminescență);

43 II. selectarea concentrației/diluției de lucru a anticorpului, astfel încât să fie asigurată
o competiție între micotoxină și conjugat. Aceasta se realizează prin incubarea off-line a unor
45 soluții de conjugat (cu concentrația de lucru selectată) cu anticorpul specific, în diverse con-
centrații. După atingerea echilibrului de formare a complexului Ag*Ab, amestecurile preincu-
47 buate sunt injectate în sistemul de imunoanaliză și sunt înregistrate semnalele de chemilu-
minescență corespunzătoare, ce vor fi notate S_{Ag*+Ab}. Reprezentarea grafică a raportului
49 (S_{Ag*+Ab}/S_{Ag*}) × 100 în funcție de concentrația/diluția anticorpului este fitată în imunoanaliză,
folosind o ecuație logistică cu patru parametri. Concentrația/diluția de lucru a anticorpului
51 corespunde unei capacități de legare a Ag* de 40...60%;

RO 127572 B1

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.

Exemplul 1. *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-AFB 1 (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 min soluțiile ale acestuia cu concentrația cuprinsă între 0,005 $\mu\text{g/mL}$ și 10 $\mu\text{g/mL}$, 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 $\mu\text{g/mL}$. 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

3

1. Sistem de imunoanaliză în flux a micotoxinelor din probe lichide, cu detecție chemiluminometrică, **caracterizat prin aceea că** este format dintr-o pompă peristaltică multicanal (**P**), un flux purtător (**a**) în care se injectează, prin intermediul unei valve (**I**), un amestec preincubat, format din proba de analizat, un antigen marcat cu peroxidază și un anticorp specific, o minicoloană (**PG**) încărcată cu un suport insolubil, pe care este imobilizată 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 (**FMT**) operat de un computer (**PC**).

5

7

9

11

2. Metodă de imunoanaliză în flux a micotoxinelor din probe lichide, **caracterizată prin aceea că** se bazează pe incubarea off-line a probei filtrate și diluate, conținând micotoxină Ag cu cantități crescute și precise de anticorp specific Ab și de antigen marcat cu peroxidază 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 minicoloana în care este imobilizată proteina G, unde va fi reținută întreaga cantitate de anticorp aflat sub formă de complex antigen-anticorp AgAb și antigen marcat-anticorp Ag*Ab, iar forma liberă a antigenului marcat este eluată și cuantificată prin evaluarea activității enzimatică a peroxidazei, pe baza reacției de chemiluminescență cu luminol și apă oxigenată, mărimea semnalului de chemiluminescență fiind proporțională cu concentrația antigenului din probă.

13

15

17

19

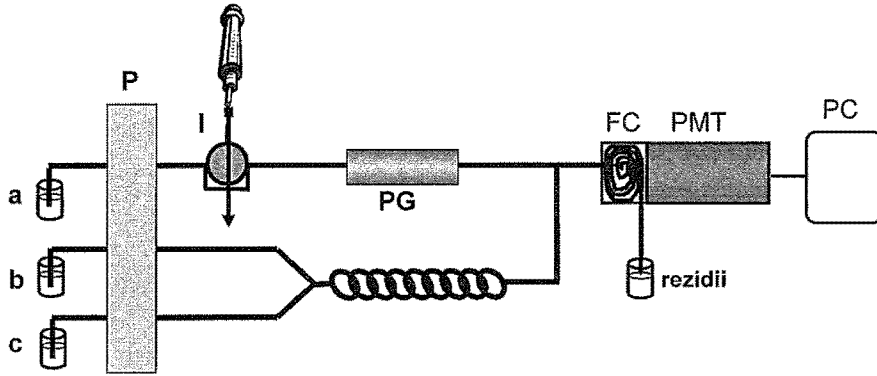


Fig. 1

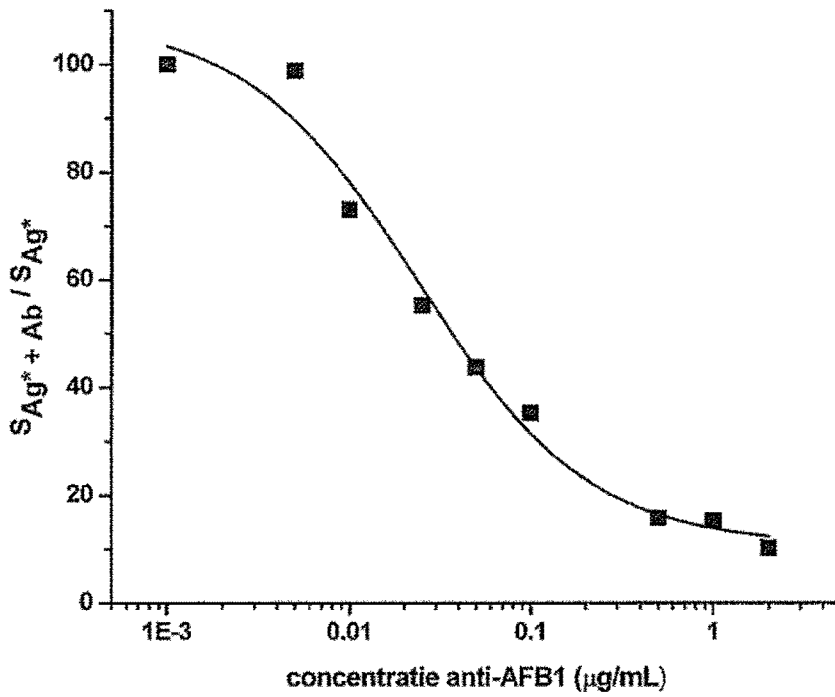


Fig. 2

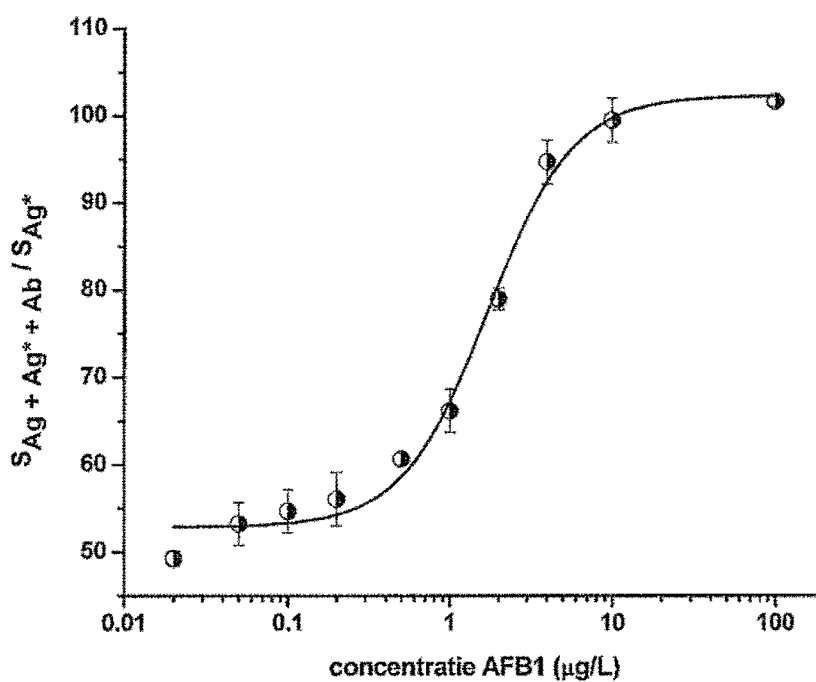


Fig. 3

