

Д. А. Долбин, Ю. А. Тюрин, Р. З. Хайруллин

ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНОГО АСКАРИДОЗНОГО АНТИГЕНА

Ключевые слова: аскаридоз, лабораторная диагностика, антиген.

Приведены данные исследования по получению высокоэффективного комплексного аскаридозного антигена для иммуноферментного анализа.

Keywords: ascariasis, laboratory diagnostics, antigen.

Data from investigation on producing a highly effective complex ascariasis antigene for immunofermental analysis are provided.

Проблемы здоровья населения России и в первую очередь его трудоспособной части, обострение демографической ситуации привели к тому, что сохранение и укрепление здоровья населения России стало одной из важнейших государственных задач. Это связано с тем, что уровень здоровья и работоспособности населения необходимо, прежде всего, рассматривать как трудовой потенциал человеческого ресурса любой страны, а молодое поколение определяет перспективы его развития в ближайшем и отдаленном будущем [1, 2].

Одной из актуальных проблем современной медицины является сложность диагностики паразитарных заболеваний человека, в частности аскаридоза. Диагностика данного заболевания современными методами особенно затруднена в случае слабой степени инвазии [3-5].

Тканевая форма аскаридоза на практике диагностируется серологическими методами. Многие тест-системы иммуноферментного анализа (ИФА), используемые в РФ, вызывают многочисленные нарекания в области специфичности диагноза, который ставится на его основе. Все это по-прежнему оставляет актуальным разработку методов выделения антигенов используемых в серологических реакциях. Поэтому целью данной работы стала разработка метода выделения комплексного антигена *Ascaris lumbricoides*.

Материалы и методы

Ascaris lumbricoides получены в лаборатории клинической диагностики специализированной поликлиники при ФГУН КНИИЭМ Роспотребнадзора.

Выделение тканевых антигенов из Ascaris lumbricoides. Для выделения антигенов проводили вскрытие червя препаровальной иглой. Затем отделяли кутикулу от висцеральных органов и отмывали 0,05М фосфатным буфером pH 7,4. Кутикулу растирали в ступке со стеклянным песком. Для экстракции использовали 0,05М трис-глициновый буферный раствор с pH 7,4-7,8 (буферные растворы готовили по общепринятым методикам). Экстракт отделяли от стромы и клеток центрифугированием со скоростью 9000 об/мин в течение 1 часа. Из полученного экстракта белки осаждали избытком ледяного ацетона и подвергали очистке методом диализа против раствора хлорида натрия 0,85 г/л, в течение

12 часов при температуре 4°C с двукратной сменой раствора. В полученном диализате концентрацию белка (предварительно) определяли по Бредфорду. Затем его подвергали разделению на хроматографической колонке, заполненной гелем сефадекс G50 (высота столба геля 65см, диаметр колонки 2,5см). Колонка калибровалась альбумином и IgG. Уравновешивали 0,05М Na-P-буферным раствором (pH 7,4). Подачу уравновешивающего раствора осуществляли с помощью перистальтического насоса (ЛКВ, Швеция). Время сбора фракций – 2 мл/мин.

Нуклеиновые кислоты определяли по методу Спирина, основанному на измерении разницы экстинкции хлорных гидролизатов, характеризующей содержание фосфора нуклеиновых кислот. Определение количества нуклеиновых кислот осуществляли следующим образом: к 1 мл раствора препарата добавляли 5 мл 5% раствора HClO_4 . Смесь помещали на водяную баню на 20 минут. После охлаждения смесь центрифугировали 20 минут при скорости вращения 2000 об/мин. при температуре 4°C. Надосадочную жидкость анализировали на спектрофотометре при длине волны 270 и 290 нм, сравнивая с контрольным 5% раствором HClO_4 .

$$K = \frac{E_{270} - E_{290}}{0,19} \times 6 \times 10,3,$$

где K – концентрация нуклеиновых кислот; 0,19 – значение $(E_{270} - E_{290})$, которое имеет гидролизат нуклеиновых кислот, содержащий 1 мкг нуклеинового фосфора в 1 мл раствора.

При дальнейших расчетах учитывали общий объем гидролизата и разведения. Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновых кислот применяли средний пересчетный коэффициент 10,3:

$$\text{Смкг НК} = \text{Смкг Фн} \cdot 10,3.$$

Определение углеводов. Определение углеводов проводили следующим образом: к 1 мл раствора образца, предварительно осажденного на ледяной бане, по стенке пробирки приливали 2 мл свежеприготовленного 2% раствора антрона в концентрированной серной кислоте. Смесь хорошо перемешивали и выдерживали на водяной бане в течение 16 мин, после чего снова охлаждали.

Оптическую плотность определяли на спектрофотометре при длине волны 625нм против контрольной пробы, содержащей 2мл антронового

реактива и 1мл растворителя, взятого для приготовления исследуемого образца. По калибровочной кривой находили содержание сахаров в препарате. Калибровка проводилась по глюкозе.

Методика проведения ИФА. Подготовка реагентов: рабочий фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ-Т) готовили разведением исходного концентрата ФСБ-Т в 25 раз. Использовали контрольные образцы, поставляемые в наборе производства «Вектор-Бест» («ВБ») для диагностики гельминтозов. В ФСБ-Т добавляли соответствующее количество концентрата конъюгата (пользовались таблицей прилагаемой к ИФА-тест-системе «ВБ») и тщательно перемешивали. В субстратно-буферный раствор (СБР) добавляли тетраметилбензидин. **Проведение иммуноферментного анализа.** Предварительно на планшет наносили кутикулярные антигены *Ascaris lumbricoides* концентрации 60 мкг/мл. После внесения в ряд стрипов 100 мкл контрольного образца, в лунки добавляли 90 мкл раствора для разведения сывороток. Исследование сывороток для определения титра предварительно разводили в семи последовательных двукратных разведениях (от 1:1 до 1:128). После проведения титрования из каждой лунки последнего ряда удаляли по 100 мкл раствора, оставляя по 100 мкл в лунках. Планшет инкубировали 30 минут при температуре 37 °С. По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и промывали лунки планшета ФСБ-Т 5 раз. В лунки вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Затем планшет инкубировали 30 мин при температуре 37 °С. По окончании инкубации стрипы опять промывали 5 раз. Во все лунки вносили по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина и инкубировали в темноте 25 мин. Реакцию останавливали путем внесения стоп-реагента. Результаты ИФА регистрировали на спектрофотометре при длине волны 492 нм.

Методика проведения электрофореза. Электрофорез белка проводили в приборе «Bio-Rad» Protean TM. Толщина геля составляла 0,75мм, карман 40мл. **Подготовка геля:** разделяющий гель (12%): разделяющий буфер pH 8,8–1 мл; акриламид–1,57 мл; H₂O–1,39 мл; N,N,N,N-тетраметилэтилендиамид–5 мл; полисульфамин–40 мл (10%). Разделяющий буфер с pH 8,8 готовили следующим образом – 500 мл 2,5 М Tris доводили концентрированной соляной кислотой до pH 8,8. Затем добавляли 0,4% SDS (2г/500мл). Концентрирующий гель (которым заполняется верхняя часть плоскости, где проводится электрофорез) имел следующий состав: разделяющий буфер pH 6,8–0,5 мл; акриламид– 0,33мл; H₂O–1,15мл; N,N,N,N-тетраметилэтилендиамид– 2 мл; полисульфамин – 20 мл (10%).

Концентрирующий буфер с pH 6,8 готовили следующим образом: 500мл 2,5М Tris доводили концентрированной соляной кислотой до значения pH 6,8. Затем добавляли 0,4% SDS (2г/500мл). Электродный буфер готовили следующим образом – на 100мл буфера для образцов добавляли 5мл меркаптоэтанола. Буфер для образцов: 10мМ Tris HCl pH 8,0; 30% глицерин, 1мМ ЭДТА; 2,5% SDS; 5% мер-

каптоэтанола. В концентрирующий гель добавляли образцы антигена *Ascaris lumbricoides* и маркеры молекулярной массы (фирма Fermentas). Окрашивали бромфениловым синим.

Пластины полиакриламидного геля сначала помещали в фиксатор №1 на 1 час. Полосы бромфенилового-синего при этом становились зелеными. Гель уменьшался в размерах, так как фиксатор адсорбирует воду. Через час фиксатор №1 меняли на фиксатор №2. Гель был смочен полностью. Затем в течение 5 мин обрабатывали следующей смесью – 0,5% G-250, 40% метанолом и 20% уксусной кислоты в 40% воды. Остатки кислоты отмывали 7% уксусной кислотой.

Результаты исследований

Диализат кутикулярного комплексный антигена разделяли на хроматографической колонке. При разделении диализата образуется несколько фракций: № 5- 9 – фракция I и № 29-32 – фракция II (рис. 1).

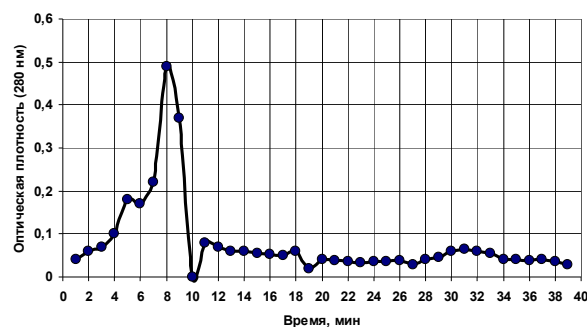


Рис. 1 – Разделение кутикулярных белков *Ascaris suum* методом колоночной гель хроматографии

При оценке содержания белка в исходном диализате кутикулы *Ascaris lumbricoides* концентрация составила – 213 мкг/мл. Химический состав отобранных фракций представлен в табл. 1.

В табл. 2 приведены результаты твердофазного ИФА с использованием фракций выделенных из кутикулы аскариды.

Выбор фракции II для дальнейшей работы произведен на основании иммунохимической активности тестируемых сывороток (положительной к аскаридам, аскаридам и токсокарам, тосокарам и отрицательным к данным гельминтам). Вторая фракция с отрицательной сывороткой дает фоновую реакцию в 1,68 раз меньше, чем с положительной сывороткой.

Таблица 1 – Химический состав двух отобранных фракций белков *Ascaris lumbricoides*

Наименование	I фракция	II фракция
Концентрация белка, мкг/мл	12,5	3,75
Концентрация нуклеиновых кислот, мкг/мл	11,38	4,87
Концентрация углеводов, мкг/мл	0,025	0,008

Таблица 2 – Иммунохимическая активность двух фракций кутикулярных белков *Ascaris lumbricoides*

Тестируемые сыворотки	Оптическая плотность (492 нм)	
	I фракция	II фракция
Положительные <i>Ascaris lumbricoides</i>	722,2 + 20	732,8 + 15
Положительные <i>Toxocaris</i> + <i>Ascaris</i>	1008,0 + 20	1172,5 + 30
Положительные <i>Toxocaris</i>	572,0 + 15	409,0 + 15
Отрицательные <i>Toxocaris</i> , <i>Ascaris</i>	629,0 + 40	373,0 + 40

Таким образом, в ИФА с использованием полученных нами антигенов, велика доля неспецифического взаимодействия с антигенами *Toxocara canis* (рис. 2).

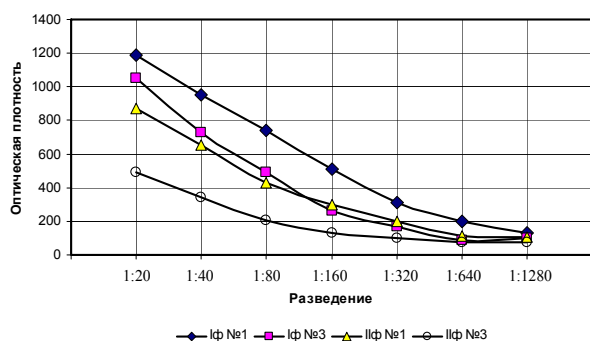


Рис. 2 – ИФА с объединенным пулом сывороток положительных (№1) и отрицательных (№3) по аскаридозу

По характеру зависимости иммунохимической активности отобранных фракций с сывороткой больного с высокой степенью инвазии аскаридами (диагноз ставился на основе данных гельминтооовоскопии и ИФА от значения оптической плотности (рис. 3) видно, что значения оптической плотности в ИФА с фракцией II значительно выше, чем фракцией I. Таким образом, для дальнейшей работы перспективней использовать именно её.

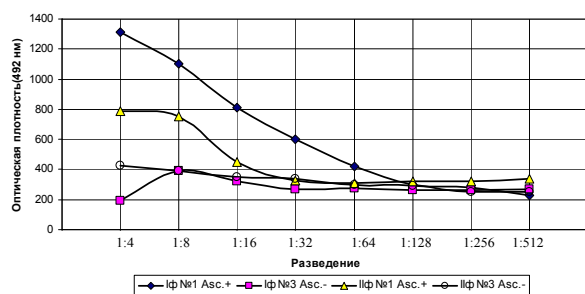


Рис. 3 – ИФА фракций белков выделенных из кутикулы *Ascaris lumbricoides* с использованием сыворотки больного с сильной степенью инвазированности аскаридами

В дальнейшем планируется провести исследования направленные на увеличение специфичности и чувствительности ИФА с использованием выделенных нами антигенов *Ascaris lumbricoides*.

Так коэффициент серопозитивности комплексного антигена *A. Lumbricoides*, определенный согласно "Инструкции по применению Тест системы иммуноферментная для выявления антител к антигенам аскариды" (производства ЗАО "Вектор бест") для положительных сывороток (1:20) составил для I фракции 2,7, для II фракции 5,7, а для отрицательных сывороток (1:20) 1,6 и 2,8 соответственно.

Для характеристики полученного кутикулярного антигена *Ascaris lumbricoides* был проведен гель SDS-электрофорез (I фракция) при использовании маркеров производства «Sigma» (США) (рис. 4).

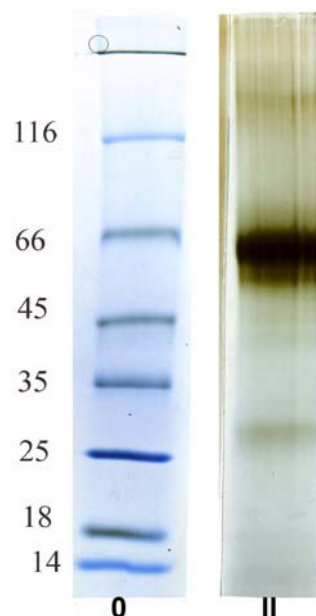


Рис. 4 – SDS-электрофорез II фракции антигена, полученного из *Ascaris lumbricoides* (О–образец для определения массы белков; II–исследуемая фракция)

Из рисунка можно сделать вывод о том, что иммунохимические свойства комплексного антигена определяются белками с молекулярной массой 50 - 70 кДа. По всей видимости, основным компонентом этого белкового пула является тропомиозин (65 кДа), а II фракция комплексного антигена *Ascaris lumbricoides* обладает большей иммунохимической активностью по сравнению с фракцией I.

Закключение

Таким образом, на основании проведенных исследований, можно утверждать, что полученные кутикулярные антигены обладают высокой эффективностью и могут быть рекомендованы для создания высокочувствительной ИФА-тест-системы.

Литература

1. Двоеносов, В.Г. Здоровье студентов как один из факторов повышения конкурентоспособности специалистов/

- В.Г. Двоеносов, Р.А. Юсупов// Вестн. Казан. технол. ун-та. –2006. –№6. –С.194-201.
2. Осипов, П.Н. О валеологической культуре будущего инженера/ П.Н. Осипов, Л.Н. Осипова Л.Н. // Вестн. Казан. технол. ун-та.–2011. –№5. –С.247-251.
 3. Талабов, М.С. Особенности клинического течения аскаридоза у детей/ М.С. Талабов, Ч.Ш. Умарова, М.Ш. Шодиев// Вестник Авиценны. –2010. –№3(44). –С.105-109.
 4. Амирбекова, Ж.Т. Аскаридоз, как фактор риска, при хронических воспалительных процессах органов репродуктивной системы женщин/ Ж.Т. Амирбекова, Б.Н. Кошеров, Б.Ж. Култанов, Б.Т. Есильбаева, Т.Т. Едильбаева// Международный журнал экспериментального образования. –2014. –№1-2. –С.53-55.
 5. Сергиев В. П., Лобзин Ю. В. и др. Паразитарные болезни человека (протозоозы и гельминтозы). – СПб, «Фолиант».–2008. –С.124–616.

© **Д. А. Долбин** – к.б.н., ст. науч. сотр лаборатории иммунологии и разработки аллергенов ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора; **Ю. А. Тюрин** – к.м.н., вед. науч. сотр. той же лаборатории; **Р. З. Хайруллин** – к.б.н., ст. препод. каф. промышленной безопасности КНИТУ, khayrullinrz@gmail.com.

© **D. A. Dolbin**, Cand. Sci. (Biol), Senior Researcher, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; **Yu. A. Tyurin**, Cand. Sci. (Med), Leading Researcher, Kazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; **R. Z. Khayrullin**, Cand. Sci. (Biol), Senior Lecturer, Department of Industrial Safety, Kazan National Research Technological University, khayrullinrz@gmail.com.