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 (LKB, 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 HClO₄. Смесь помещали на водяную

баню на 20 минут. После охлаждения смесь центрифугировали 20 минут при скорости вращения 2000 об/мин. при температуре 4оС. Надосадочную жидкость анализировали на спектрофотометре при длине волны 270 и 290 нм, сравнивая с контрольным 5% раствором HClO₄. где К-концентрация нуклеиновых кислот; 0,19-значение E(E270-E290), 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: Смкг НК = СмкгФн·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 оС. 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 оС. 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 M 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 2,5M 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% меркаптоэтанола. 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

фрагментация белков. 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

фрагментация белков. 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 *Ascaris lumbricoides* 722,2 + 20 732,8 + 15 Положительные *Toxocar* + *Ascaris* 1008,0 + 20 1172,5 + 30 Положительные *Toxocar* 572,0 + 15 409,0 + 15 Отрицательные *Toxocar*, *Ascaris* 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 гельминтоовоскопии 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 инвазированнойности 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. Заключение Таким образом, на основании проведенных исследований, можно утверждать, что полученные кутикулярные антигены обладают высокой эффективностью и могут быть рекомендованы для создания высокоэффективной ИФА-тест-системы.