

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.98:579.861.2]-078.33

Ш.С.ТАШМУХАМЕДОВА, М.М.РАХИМОВ, Х.К.СУЛТАНОВ

ИФА СТАФИЛОКОККОВОГО ТОКСИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИАМИДНЫХ МИКРОПОРИСТЫХ МЕМБРАН

Ташкентский государственный университет, Ташкентский педиатрический институт

В настоящее время иммуноферментный анализ (ИФА) является одним из высокочувствительных методов диагностики многих заболеваний, в том числе и стафилококковых [2]. Вместе с тем имеющиеся диагностикумы и методы анализа постоянно совершенствуются в отношении подбора более подходящих ферментных меток, перехода к безынструментальным методам ИФА и др.

Одним из простых и легко осуществимых в условиях клиники методов ИФА для стафилококковой пневмонии является определение токсина методом ИФА на полиамидных гранулах [3]. Сущность метода заключается в следующем: к строго определенной навеске полиамидных гранул с известным количеством свободных аминогрупп ковалентно присоединяют антитела к стафилококковому токсину. К другой порции антител присоединяют фермент фосфолипазу A_2 для получения смешанных конъюгатов антител и фермента. При проведении анализа определяют количество жирных кислот, выделившихся при гидролизе субстрата лецитина из яичных желтков [4]. Метод показал хорошие результаты при диагностике стафилококковых заболеваний различной этиологии как в эксперименте, так и в условиях клиники [3, 4], однако со временем выявились некоторые факторы, отрицательно влияющие на воспроизводимость метода.

Во-первых, полиамидные гранулы неодинаковы по своим размерам, что, естественно, приводит к определенному разбросу по площади поверхности, а следовательно, и доступному числу аминогрупп (NH_2) для связывания с антителами.

Во-вторых, при хранении гранул на их поверхности образуются микроредфекты, которые в ходе проведения анализов приводят к неспецифической сорбции конъюгатов антител с ферментом и, как следствие, происходит либо "ложное" выявление токсина, либо результаты анализов оказываются завышенными.

Третья причина заключается в выборе ферментной метки. В цитируемых работах [2 — 4] использовали фосфолипазу A_2 из яда большого шершня — довольно редкого объекта. В связи с тем, что это насекомое попало в число редких и исчезающих видов, получение яда и выделение из него фосфолипазы A_2 стало проблематичным.

Наконец, еще одна причина заключается в использовании конъюгата, полученного путем введения бифункциональных агентов в смесь антител и фосфолипазы A_2 . При таком способе конъюгации наряду с образованием нужных ассоциатов антител — фермент в смеси образуются и другие ассоциаты за счет протекания в среде взаимодействия типа антитело — антитело, фермент — фермент, а также более сложные образования. Это сказывается на чувствительности ИФА, так как известно, что он в значительной степени зависит от чистоты полученных конъюгатов.

Все указанные выше причины резко снижают ценность и информативность в целом очень удачного метода проведения ИФА. Исходя из вышеизложенного, целью наших исследований была модификация этого метода в части замены носителя для иммобилизации антител, подбора другой ферментной метки и разработки нового способа очистки конъюгата фермента с антителами.

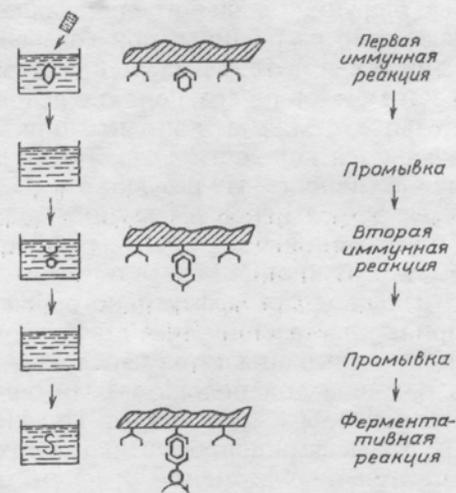
Методика. Получение иммобилизованных антител. В качестве носителя для иммобилизации антител мы использовали микропористые капроновые мембраны с размером пор 0,2 мкм (ТУ 15/16 РЭ 3-85, экспериментальная лаборатория "Хийу-Калур"). Для иммобилизации антител полиамидные мембраны помещали в бюксы с 2,5 н. соляной кислотой и инкубировали 2 ч. Избыток кислоты удаляли промыванием мембран дистиллированной водой, а затем 0,05 М, 0,1 М боратным буфером рН 8,2. К активированным таким образом полиамидным мембранам добавляли 2,5% раствор глутарового диальдегида и инкубировали 2 ч при комнатной температуре в том же буфере. После инкубации мембраны вновь промывали буферным раствором, а затем добавляли раствор антител (25 мкг/мл) в том же буфере и инкубировали 48 ч при 4°C в условиях непрерывного перемешивания. Несвязавшиеся антитела удаляли промыванием буферным раствором до исчезновения следов белка [5]. Количество антител, связанных с полиамидом, определяли по разности содержания белка в растворе до и после инкубации.

Получение и очистка конъюгатов антител и фермента. В качестве ферментной метки использовали α -амилазу, очищенную из технического препарата амилоризин П10х по разработанной нами методике [1]. Конъюгаты антител с α -амилазой получали по следующей методике: к 1,15 мг α -амилазы в 0,1 М боратном буфере рН 8,2 добавляли 0,5 мг антител в том же буфере до объема 5 мл. Затем к этой смеси при интенсивном перемешивании прибавляли по каплям 0,1 мл 0,05% раствора глутарового диальдегида в том же буфере. После инкубации в течение 12 ч проводили диализ против дистиллированной воды, центрифугировали и определяли содержание белка в растворе по методу Лоури [5]. Амилазную активность конъюгатов определяли йодометрическим методом [6]. Проверляли также иммунологическую активность полученного конъюгата к стафилококковому токсину по реакции двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони [6].

Для очистки конъюгата от непрореагировавших и балластных компонентов применяли гель-хроматографию на колонке (1,5x100 см), наполненной TSK-гелем HN-55 в 0,05 трис-НСl-буфере рН 8,2 при скорости элюции 42 мл/ч. Детекцию белков осуществляли на ультрафиолетовом абсорбиометре UVICORD S (LKB, Швеция) при длине волны 280 нм. Фракции собирали по 5 мл на автоматическом коллекторе ULTRARAC (LKB, Швеция). Фракции, обладающие наибольшей ферментативной и серологической активностью, объединяли и диализовали против 0,05 М трис-НСl-буфера рН 8,2 и концентрировали до объема 1 мл.

Процедура проведения анализа. Полиамидные мембраны с иммобилизованными антителами последовательно погружали в ряд растворов (см. схему). Перед использованием мембраны предварительно трижды промывали 0,05 М трис-НСl-буфером рН 7,5 и уравнивали в 0,05 М трис-НСl-буфере рН 7,5, содержащем 30 мМ СаСl₂ и 5% этиленгликоля.

Первый раствор по ходу погружения представлял собой раствор антигена (или определяемую пробу). В этом растворе мембраны инкубировали в течение 15 — 20 мин при 37 °С. После первой иммунной реакции непро-реагировавшие компоненты трехкратно отмывали 0,05 М трис-НСl-бу-фером рН 7,5. Второй раствор по ходу погружения — это раствор конъю-гата антител с ферментом (20 мкг/мл по белку). Инкубацию в этом рас-творе проводили в течение 20 мин, затем вновь осуществляли промывку буфером, после чего мембраны погружали в раствор субстрата, проводи-ли измерение амилазной активности и по калибровочной кривой судили о количестве α -токсина в исследуемой пробе (очищенный α -токсин был любезно предоставлен нам сотрудником НИИ физиологии и биофизики АН Республики Узбекистан доктором биологических наук О.В.Красиль-никовым).



Примечание.

- — антиген;
- — фермент;
- — конъюгат антитело-фермент;
- Y — антитело;
- S — субстрат;

Результаты и обсуждение. Известно, что при проведении ИФА наиболее жесткие требования предъявляются к подбору носителя. Поэтому в разработанной нами методике ИФА для выявления стафилококкового токсина в целях ускоренной диагностики пневмонии стафилококковой этиологии в качестве носителя были применены полиамидные мембраны (ПМ). ПМ с практической точки зрения оказались более удобными и перспективными в связи с их дешевизной, доступностью, механической прочностью, ненабухаемостью в воде и буферных растворах, легкостью

перехода в реакционноспособную форму и устойчивостью к действию микроорганизмов. Кроме того, NH_2 -группы на поверхности ПМ расположены строго равномерно, что в отличие от полиамидных гранул при проведении анализов предотвращает неспецифическую сорбцию конъюгатов с ферментом, вследствие чего возможное "ложное" выявление токсина практически исчезает.

В качестве ферментной метки использовали α -амилазу, очищенную из технического препарата амилорезин П10х по разработанной нами методике [1]. Выбор этого фермента обусловлен его доступностью, дешевой и легкостью тестирования, а также высокой каталитической активностью. Кроме того, он дает окрашенные продукты реакции, тестируемые визуально, что также можно использовать в качестве тестовой реакции при разработке метода ИФА.

Иммобилизацию антител к активированным ПМ осуществляли с помощью глутарового диальдегида. Конъюгат антител с α -амилазой получали также с помощью бифункционального сшивающего реагента глутарового альдегида. Как видно из таблицы, при ковалентном связывании антител с α -амилазой активность фермента уменьшается. Снижение амилазной активности у конъюгатов по сравнению с исходной активностью фермента тем значительнее, чем выше концентрация антител в среде. В то же время в образующемся конъюгате сохраняется довольно высокая удельная и антигенная активность. Из результатов тестирования можно заключить, что наиболее эффективное связывание молекул α -амилазы и антител происходит при соотношении 1:0,5 (см. таблицу) и концентрации альдегида 0,05% в инкубационной среде объемом 5 мл. Это соотношение является оптимальным для эффективного использования полученного конъюгата при осуществлении ИФА стафилококкового токсина.

Кроме того, при получении конъюгатов наряду с антителами, мечеными ферментом, в растворе при использовании сшивающих агентов образуются конъюгаты разнообразного состава. Полученные конъюгаты могут быть загрязнены примесями непрореагировавших с ферментом антител, а также конъюгатами типа фермент — фермент, антитело — антитело. Эти примеси мешают практическому применению ИФА, снижают чувствительность метода и поэтому их необходимо отделить от реакционной смеси. В связи с этим необходимо было провести очистку синтезированного конъюгата. Для очистки конъюгата применяли метод гель-хро-

Зависимость ферментативной и антигенной активности конъюгата от содержания антител в инкубационной среде

Вариант конъюгации	Реагирующий компонент			Активность конъюгата, ед/г	Объем, мл	Активность конъюгата по глубине гидролиза, % при ИФА						
	ГА	антитела, мг	амилаза, мг			содержание токсина в пробе, нг/мл						
						5000	500	50	5	0,5	0,05	0,005
1-й	0,05	0,5	1,15	38176,4	5	29,7	25,4	19,6	14,3	9,3	2,5	0
2-й	0,05	1,0	1,15	29092,8	5	26,1	23,2	17,7	14,0	7,9	1,9	0
3-й	0,05	2,0	1,15	26893,5	5	19,0	15,2	10,2	8,3	6,4	1,02	0
4-й	0,05	3,0	1,15	23108,1	5	15,4	12,7	12,1	6,5	3,7	0,18	0

Примечание: ГА-глутаровый диальдегид. Данные, приведенные в таблице, соответствуют разнице между данными ИФА и фоном

матографии с TSK-гелем HN-55. Как видно из рис. 1, в результате хроматографии было получено 4 фракции. Из полученных фракций только фракция № 2 обладала как серологической, так и ферментативной активностью. Вероятно, комплекс антитело — антитело содержится во фракции № 1, поскольку эта фракция является наиболее высокомолекулярной, а комплекс фермент — фермент и непрореагировавший фермент и антитело содержатся во фракциях № 3 и 4.

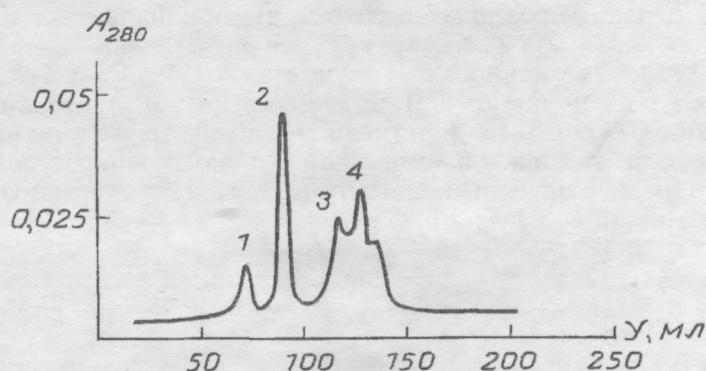


Рис. 1. Гель-хроматография конъюгата антител к СТ на колонке с TSK-гелем HN-55 (1,5 × 100 см) в 0,05 М трис-НСl-буфере рН 8,2; скорость элюции 42 мл/ч.

Следующим этапом исследований было определение оптимальной концентрации конъюгата для проведения ИФА (рис. 2). Представленные на рис. 2 результаты тестирования стафилококкового токсина (СТ) в концентрациях 5, 50, 500 и 5000 нг/мл на мембранах массой 16,2 мг (для иммобилизации использовано 25 мкг антител) показывают, что более высокий процент продуктов ферментативной реакции образуется через 15 мин гидролиза при использовании для ИФА конъюгата в концентрации 20 мкг/мл.

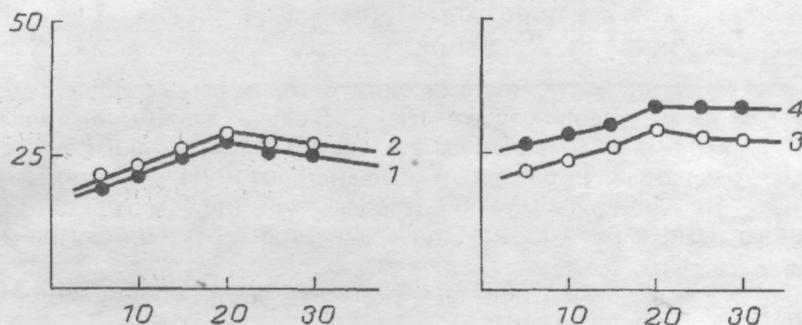


Рис. 2. Определение концентрации конъюгата, оптимальной для постановки “сэндвич”-варианта ИФА СТ.

1 — содержание СТ в пробе 5 нг/мл, 2 — 50 нг/мл, 3 — 500 нг/мл, 4 — 5000 нг/мл. По осям абсцисс — количество конъюгата (в мкг), по осям ординат — глубина гидролиза в (%%).

Следует отметить, что при тестировании СТ в концентрации 5, 50, 500 нг/мл численное значение количества продуктов гидролиза находится на одинаковом уровне, по-видимому, из-за слишком высокого содержания СТ, хотя наиболее высокая глубина гидролиза наблюдается при тестировании СТ в концентрации 5000 нг/мл. Возможно, данный результат достигается за счет специфически связанного конъюгата с СТ, т.е. с увеличением концентрации СТ в среде пропорционально увеличивается и количество специфически связанного конъюгата.

Из представленных результатов следует, что при постановке ИФА СТ концентрация конъюгата 20 мкг/мл является оптимальной.

С учетом вышеизложенного был осуществлен ИФА СТ в очищенном препарате СТ в диапазоне от 0,01 до 30 нг/мл (рис. 3). С уменьшением концентрации СТ снижается и активность, что также свидетельствует о сохранении ферментативной и антигенной активности конъюгата. Из рис. 3 видно, что нижнее значение концентрации СТ, которое можно определить этим методом, составляет 0,05 нг/мл.

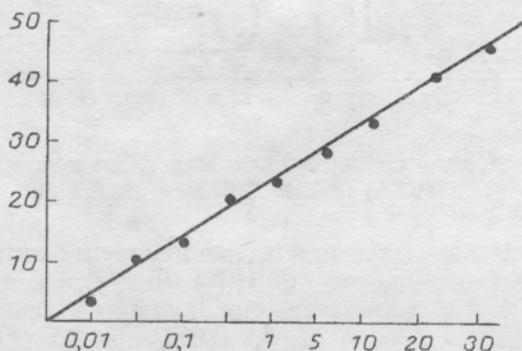


Рис. 3. Калибровочная кривая, построенная при использовании очищенного СТ.

По оси абсцисс — концентрация антигена (в нг), по оси ординат — глубина гидролиза (в %).

При клинических испытаниях было обследовано 327 больных пневмонией токсическим, циркуляторным и гнойным осложнениями.

При исследовании бактериологическим методом были выявлены 0,6% больных, у которых в крови содержался СТ. В случае же ИФА были выявлены 11,8% больных с содержанием в крови СТ с токсическим осложнением, 7,6% с кардиореспираторным осложнением и 2,4% с гнойным осложнением. Это свидетельствует о более высокой информативности разработанного нами варианта ИФА по сравнению с бактериологическим методом.

Такая высокая информативность достигается за счет специфичности и высокой чувствительности ИФА.

По сравнению же с ранее опубликованным методом ИФА [3] предлагаемый метод, сохраняя простоту осуществления, дает более надежные результаты испытания, особенно в области низких концентраций СТ. Вместе с тем применение амилазы в качестве ферментной реакции позволяет использовать для детекции многочисленные существующие под-

ходы анализа крахмала и продуктов его расщепления, включая и такой простой визуальный метод, как йодкрахмальная реакция.

Таким образом, нами был разработан чувствительный метод ИФА СТ в биопробах, отличающийся простотой воспроизведения, не требующий специального дорогостоящего оборудования.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 20264. Препараты ферментные: Методы определения амилазной активности. — М., 1975.
2. Рахимов М.М., Нажмитдинов А.М., Султанов Х.К. Иммуноферментный анализ в диагностике заболеваний стафилококковой этиологии у детей: Метод. рекомендации. — Ташкент, 1985.
3. Султанов Х.К. Ускоренные методы диагностики стафилококковой пневмонии у детей раннего возраста: Метод. рекомендации. — Ташкент, 1984.
4. Султанов Х.К., Рахимов М.М., Рахматуллаев А.К., Шамсиев Д.С. // Мед. журн. Узбекистана. — 1989. — № 2. — С. 54-58.
5. Ташмухамедова Ш.С., Хасанов Х.Т., Рахимов М.М. и др. // Приклад. биохим. — 1993. — № 3. — С. 28-32.
6. Ouchterlony O. // Progr. Allergy. — 1958. — Vol. 6. — P. 30.

Поступила 18.11.94

ENZYME IMMUNOASSAY FOR STAPHYLOCOCCAL TOXIN WITH THE USE OF POLYAMIDE MICROPOROUS MEMBRANES

Sh. S. Tashmukhamedova, M. M. Rakhimov, Kh. K. Sultanov

Tashkent State University and Tashkent Pediatric Institute

The optimum conditions for extraction of catalytic active conjugates of α -amylase and antibodies for staphylococcal toxin (ST) have been created. The optimum correlation of antibodies and enzyme for the effective use of the extracted conjugate during enzyme immunoassay for ST has been established. The covalent immobilization of antibodies on the microporous polyamide membranes has been carried out. Apart from this, the extracted conjugates were purified by TSK-gel HN-55 chromatography. The optimum concentration of the conjugates has been defined.