

И.С.Тюменцева, Е.Н.Афанасьев, Л.В.Ляпустина, О.И.Коготкова, И.В.Жарникова, В.И.Ефременко, Д.А.Будыка, Н.Ф.Василенко, Е.Е.Афанасьева, А.Н.Куличенко

ИММУНОМАГНИТНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

На основе кремнезема – алюмосиликата, модифицированного полиглиукином и вторичным алкилсульфатом натрия, получены композиционные микрогранулированные иммуномагнитные сорбенты (ИМС), которые имеют высокую адсорбционную активность за счет развитой поверхности и привитого специфического лиганда, характеризуются стандартностью структурных характеристик, обладают механической прочностью, химической и микробиологической устойчивостью, присутствие магнитного материала обеспечивает упрощение и удобство манипуляций с сорбентами при проведении анализов. Применение ИМС позволяет на этапе подготовки пробы путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освободиться от всевозможных примесей, тем самым исключая их отрицательное влияние на реакцию, максимально концентрируя искомый патоген, что повышает специфичность и чувствительность методов экспресс-анализа (ИФА и ПЦР), при этом значительно сокращается время проведения анализа (до 1–3 ч).

Ключевые слова: антиген, антитело, экспресс-диагностика инфекционных болезней, иммуномагнитный сорбент, химическая модификация, чувствительность, специфичность, биотехнология.

Одним из приоритетных направлений в лабораторной диагностике инфекционных болезней является разработка высокоэффективных способов концентрирования патогенов в исследуемом материале с последующей детекцией их антигенов или нуклеиновых кислот, либо их селективной сепарацией для бактериологических или вирусологических исследований. Одним из перспективных методов концентрирования при идентификации микроорганизмов непосредственно в исследуемом материале является применение иммуномагнитной сепарации. Основой ее методологии является использование магнитных частиц с антителами, маркерными белками, либо иными лигандами, иммобилизованными на их поверхности, что обуславливает возможность высокоэффективного распознавания антигенов и других целевых молекул, их концентрации и выделения из сложных биологических образцов [13]. В качестве сорбционного материала используют различные вещества неорганической и органической природы: целлюлозу, полистирол, агарозу, поливинил, хитин и др. Особую нишу среди материалов, используемых для получения сорбентов, занимают кремнеземы (пористые стекла, силикагель, силохромы, аэросил и т.п.), имеющие ряд преимуществ: физическую и химическую устойчивость, хорошо развитую поверхность, на которой может находиться до 5 видов функционально активных групп (гидроксильные, силанольные, силоксановые, геминальные гидроксильные, викалинальные гидроксильные группы). Это делает возможным проводить химическую модификацию поверхности кремнезема в заданном направлении [1, 5, 8, 9]. Разнообразие реакций химического модифицирования поверхности кремнезема и используемые при этом приемы часто более напоминают химию органическую, чем неорганическую [11]. Введение в элементный состав кремнеземных сорбентов оксидов

металлов (Al, Ni, Co, Fe) придает им дополнительные свойства: на сорбирующей поверхности образуются электронно-акцепторные (Льюисовские) и протон-донорные (Бренстедоновские) центры, что обуславливает супермагнетизм частиц. За счет этого микро-частицы не «склеиваются» в суспензии [10, 13].

Цель исследования – получение иммуномагнитных сорбентов (ИМС) на основе прочной, технологичной неорганической матрицы для мониторинга возбудителей бактериальной и вирусной природы.

Материалы и методы

В работе использовали обеззараженные бактериальные массы возбудителей холеры, сибирской язвы, лептоспироза, кампилобактериоза, листериоза, из которых изолировали водорастворимые комплексы по методу Е.Н.Афанасьева [2]. Гипериммунные кроличьи сыворотки получали по схемам, разработанным И.С.Тюменцевой и соавт. [6]. Антигены и асцитические жидкости к вирусам КГЛ, ЛЗН получены из ГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН (Москва). Биологическим компонентом при конструировании гепатитного ИМС служила иммунная сыворотка человека, полученная в стадии реконвалесценции. Иммуноглобулины фракционировали из сывороток крови и асцитических жидкостей полиэтиленгликолем – 6000 [14]. Активность антигенов, сывороток, иммуноглобулинов определяли методом радиальной диффузии по О.Оuchterlony [12]. Удельную поверхность магносорбентов (МС) определяли по методу А.А.Клячко-Гурвича [4], а суммарный объем и радиус пор – по методу Н.В.Кельцева [3]. Микроструктуру сорбентов исследовали на сканирующем электронном устройстве IMZ-T3000 по методике Д.Фрайфельдера [7].

Результаты и обсуждение

Синтез МС с высокой сорбционной активностью осуществлен методом формирования структуры носителя в присутствии органических полимеров. В качестве сорбционного материала использовали алюмосиликат (ТУ 38-10276-84), который представляет собой тонкодисперсный продукт, содержащий двуокись кремния и оксид алюминия. Химическое модифицирование поверхности сорбента осуществляли в присутствии полимера декстрана (полиглюкина) и поверхностно-активного вещества (ПАВ) – вторичного алкилсульфата натрия.

Механизм образования пористого кремнийорганического магносорбента в присутствии полиглюкина сопровождается формированием корпускулярной структуры кремнеземного скелета из непористых частиц кремнезема и включением в данный остов полимера (декстрана) за счет многоточечной адсорбции на катионообменных центрах поверхности кремнеземного носителя.

При активировании твердофазного носителя на поверхности его частиц образуется мономолекулярный адсорбционный слой, препятствующий сближению частиц, их агрегированию и образованию пространственных структур. ПАВ, растворяясь в воде, образует мицеллы, которые благодаря гидрофобности, связывают мономерные формы поверхностных белков. При этом образуются структуры, напоминающие пчелиные соты. Они обеспечивают эффективное действие, намного превышающее эффективность исходных белков.

Процесс получения магносорбента осуществляли следующим образом: к 1 г алюмосиликатного наполнителя добавляли 40 мл 3 % водного раствора полиглюкина и 2 г магнитного порошка (Fe_2O_3), перемешивали и проводили гелеобразование при температуре $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ в течение 2 ч. Значение рН гелеобразования составляло 7,0. Полученный сорбент высушивали при $100\text{--}110^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, измельчали и методом рассева выделяли фракции с размером частиц 80–120 микрон. На стадии гидрогеля протекают конденсационные процессы с участием силановых групп частиц алюмосиликата, происходит перераспределение вещества, частицы укрупняются, контакты срастаются. Синерезис (самопроизвольное уменьшение объема геля с отделением жидкости) происходит в результате уплотнения пространственной структуры сетки, образованной частицами дисперсной фазы. Структурированная система при синерезисе переходит в термодинамически более устойчивое состояние. При термообработке гидрогель превращается в ксерогель, при этом объем гидрогеля уменьшается более чем в 10 раз, благодаря действию капиллярных сил. Таким образом, ксерогель композиционного магносорбента – это корпускулярная система, состоящая из аморфных частиц кремнезема, покрытых органическим полимером (декстраном), связанных друг с другом в пространственном каркасе. При корпускулярном

строении композиционных сорбционных материалов поры представляют собой пустоты между глобулами. Исследование удельной поверхности показало, что сорбент, не содержащий в своем составе Fe_2O_3 , имеет удельную поверхность – $58\text{ м}^2/\text{г}$, объем пор – $1,70\text{ см}^3/\text{г}$, радиус пор – $42,5\text{ нм}$. Введение оксида железа в структуру кремнеземного сорбента изменяло его структурные характеристики: удельная поверхность имела значение $18\text{ м}^2/\text{г}$, объем пор – $1,19\text{ см}^3/\text{г}$, радиус пор – $132,2\text{ нм}$. В микроструктуре поверхности алюмосиликатного МС сочетаются обширные участки сплошной непористой массы со структурой губчатого характера. По данным электронной микроскопии, алюмосиликатный сорбент в своей структуре объединяет элементы структуры, характерные для макропористого стекла и гидротермального силохрома С-120. Магнитный порошок, входящий в состав структуры композиционного сорбента, усиливает срастание глобулярных частиц в сплошные непористые участки за счет участия силанольных групп поверхности – Si-OH в дегидратационных процессах.

Для химического активирования МС использован вторичный алкилсульфат натрия. Оно заключалось в следующем: к 1 г МС приливали 7,5 мл дистиллированной воды, содержащей 0,25 мл ПАВ. Смесь инкубировали 1–2 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, затем сорбент отмывали 100 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 100 мл дистиллированной воды. Для придания магносорбенту биоспецифических свойств проводили иммобилизацию специфических белковых лигандов (Ig G) в концентрации 2,5–3 мг/мл методом ковалентного связывания в течение 2 ч, при значении рН раствора белка 6–7 и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Эффективность использования иммуномагнитных сорбентов была продемонстрирована во время вспышки холеры в Республике Дагестан в 1994 г. Холерные ИМС, помещенные на специальные магнитные «ловушки», ставили в канализационные стоки, оросительные каналы, артезианские колодцы и другие объекты. Доставляемые пробы исследовали методом количественной иммунофлуоресценции (КИФА) и бактериологическим методом путем посева сорбентов на питательные среды. Методом КИФА удалось получить 15 положительных результатов. Из канализационных стоков одного из поселков, кроме дважды подтвержденных люминесцентно-серологическим методом результатов, удалось выявить культуру холерного вибриона при посеве сорбентов на питательные среды. Общепринятым бактериологическим методом ни в одном случае выделить культуру холерного вибриона не удалось.

Впервые использование магнитных лептоспирозных сорбентов с ИФА позволило осуществить крупномасштабный мониторинг поверхностных водоемов Краснодарского края на наличие в них лептоспир во время эпидемиологических вспышек в 1997–1998, 2003, 2005 гг. Положительные результаты на наличие лептоспир были получены в 78 % исследованных проб, что подтверждено традиционными методами.

Предварительное избирательное концентрирование на ИМС позволило повысить специфичность традиционных экспрессных анализов (ИФА и КИФА) и увеличить выявляемость возбудителей кампилобактериоза и листериоза на 9,4–11,8 % при исследовании 1946 проб из объектов внешней среды (смывы с рук ветеринарных работников, пробы почвы, воды, пищевых продуктов, дикая и домашняя птица, грызуны).

В 2001 г. во время вспышки сибирской язвы в Красногвардейском районе Ставропольского края лишь в сочетанном методе (ИМС+КИФА) удалось выявить споры возбудителя сибирской язвы в пробах почвы. Традиционные методы дали отрицательный результат. Использование ИМС с ПЦР повысило чувствительность этой реакции на порядок.

В результате применения тест-системы диагностической магноиммосорбентной для экспресс-диагностики вирусного гепатита А (в ИФА и ПЦР) во время вспышки в ст. Зеленчукской Карачаево-Черкесской Республики в январе–марте 2004 г., когда заболело 180 человек, был установлен источник инфекции и подтвержден водный путь распространения, что позволило провести эпидемиологическое расследование, на основании которого были приняты оптимальные решения и реализованы конкретные мероприятия по ее ликвидации. При исследовании материала традиционными ИФА и ПЦР положительных проб не выявлено.

Диагностическая ценность и преимущества ИМС были подтверждены во время вспышек КГЛ на территории Ставропольского края в 2000–2004 гг. при исследовании клинического и полевого материала (иксодовые клещи, собранные в природных очагах инфекции). Их применение в сочетании с ИФА и ПЦР позволило повысить выявляемость заболеваний и определение инфекционного агента до 50 %.

Впервые на территории Ставропольского края при исследовании полевого материала (комаров и клещей) с применением разработанного ЛЗН-сорбента установлена циркуляция вируса лихорадки Западного Нила, при этом основным переносчиком определены комары рода *Aedes*, а резервуаром – клещи *Hyalomma marginatum*. Проведение ИФА и ПЦР с привлечением сорбционной технологии позволило максимально сконцентрировать вирус ЛЗН, что повысило число положительных находок в 2–2,5 раза.

Таким образом, на основе кремнезема-алюмосиликата, модифицированного полиглюкином и вторичным алкилсульфатом натрия, получены иммуномагнитные сорбенты, применение которых позволяет на этапе подготовки пробы путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освободиться от всевозможных примесей, тем самым исключить их отрицательное влияние на реакцию, максимально концентрировать искомый патоген, что повышает специфичность и чувствительность методов экспресс-анализа (ИФА и ПЦР), при этом сокращается время их проведения (до 1–3 ч), значительно повышается достоверность как положитель-

ных, так и отрицательных результатов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айлер Р. Химия кремнезема. М.: Мир; 1982. 127 с.
2. Афанасьев Е.Н. Научно-методические аспекты экспресс-диагностики возбудителей особо опасных зоонозных инфекций (чума, бруцеллез, сибирская язва) [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Ростов Н/Д; 2000. 45 с.
3. Кельцев Н.В. Основы адсорбционной техники. М.: Химия; 1984. 280 с.
4. Клячко-Гурвич А.А. Методы определения удельной поверхности. М.: АН СССР, 1961. 10. 1885 с.
5. Неймарк Н.Е. Синтетические минеральные адсорбенты и носители катализаторов. Киев: Наукова Думка; 1982. 210 с.
6. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Жданова Е.В., Жарникова И.В., Афанасьев Н.Е., Лаврешин М.П. и др. Разработка рациональной биотехнологии получения диагностических иммунных сывороток. Вестник Российской военно-медицинской академии. СПб; 2008; 1-2(22):210–1.
7. Фрайфельдер Д. Физическая биохимия. М.: Мир; 1980. 73 с.
8. Ходж Ф. Органические реакции с использованием реагентов или субстратов, ковалентно закрепленных на функционализированных неорганических носителях. Журнал Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева. 1989; 34(3):331–9.
9. Чуйко А.А., Горлов Ю.И. Строение поверхности пирогенного кремнезема, природа его активных центров и механизмы сорбционных процессов. В кн.: Кремнеземы в медицине и биологии: Сб. научн. трудов. Киев – Ставрополь; 1993. С. 4–41.
10. Bangs J.B. New developments in particle – based immunoassays: introduction. Pure Appl. Chem. 1996; 68(10):1873–9.
11. Burwell R.L. Modified silica gels as adsorbents and catalysis. J. Chem. Technol. 1974; 15(1):370–7.
12. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gel. Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi. 1949; 261(14):1–9.
13. Peruski A.N., Peruski L.F.Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2003; 10(4):506–13.
14. Polson A., Potgieter G.M., Largier J.E. et al. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. J. Biochem. Biophys. Acta. 1964; 82:464–75.

Об авторах:

Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ляпустина Л.В., Коготкова О.И., Жарникова И.В., Ефременко В.И., Будыка Д.А., Василенко Н.Ф., Афанасьева Е.Е., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355106, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

I.S.Tyumentseva, E.N.Afanas'ev, L.V.Lyapustina, O.I.Kogotkova,
I.V.Zhamikova, V.I.Efremenko, D.A.Budyka, N.F.Vasilenko,
E.E.Afanas'eva, A.N.Kulichenko

Immune-Magnetic Absorbents Used for Express Diagnosis of Dangerous Infectious Diseases: Biotechnology Aspects and Experience of Application

Stavropol Anti-Plague Research Institute

Compositional micro-grained immune-magnetic absorbents (IMA) were obtained on the basis of silica – aluminosilicate, modified by polyglucin and sodium secondary alkylsulphate. IMA were shown to possess high adsorption activity due to their developed surface and implanted specific ligand, standard structural features, mechanical reliability, chemical and microbiological stability. The existence of magnetic material provided facilitation and convenience of operations with absorbents in analysis performance. Applying of IMA allowed to release of any mixtures with their adverse effect on reaction during samples preparing by means of rinsing the absorbent with fixed infected agent on it; concentrating the unknown pathogen to the extent possible increased the specificity and sensitivity of express-analysis methods (EIA and PCR), the time spending for analysis reduced substantially (up to 1–3hours).

Key words: antigen, antibody, express-diagnosis of infectious diseases, immune-magnetic absorbents, specificity, sensitivity, chemical modification, biotechnology.

Authors:

Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Lyapustina L.V., Kogotkova O.I., Zhamnikova I.V., Efremenko V.I., Budyka D.A., Vasilenko N.F., Afanas'eva E.E., Kulichenko A.N. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 20.04.09.