



ФАГОВЫЕ МИНИ-АНТИТЕЛА В ДЕТЕКЦИИ СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА А

© 2016 г. К. К. Фурсова^{*,**}, М. П. Щанникова^{*,**}, А. О. Шепеляковская^{*,**},
Л. Л. Павлик^{***}, Ф. А. Бровко^{*,**, #}

^{*}ФГБНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства
имени акад. Л.К. Эрнста”, п. Дубровицы

^{**}Филиал ФГБНУН Института биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пушкино, пр. Науки, 6^{*}

^{***}ФГБНУ Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пушкино

Поступила в редакцию 07.08.2015 г. Принята к печати 09.10.2015 г.

Разработан метод детекции энтеротоксина А стафилококков иммуноферментным анализом в сэндвич-варианте. В качестве улавливающих первых антител использованы моноклональные антитела мыши против энтеротоксина А, в качестве детектирующих – рекомбинантные мини-антитела к энтеротоксину А в фаговом формате (фаговые антитела), полученные ранее из дисплейной библиотеки фрагментов scFv. Предел детекции составил 6–12.5 нг/мл для разных пар антител. Исследованы условия хранения препаратов фаговых мини-антител в растворенном и лиофилизированном состояниях. Показано, что использование трегалозы и аргинина в качестве стабилизирующих агентов при лиофилизации фаговых препаратов мини-антител способствует сохранению функциональной активности.

Ключевые слова: энтеротоксин А стафилококков, фаговые антитела, сэндвич-иммуноферментный анализ.

DOI: 10.7868/S0132342316020032

ВВЕДЕНИЕ

Энтеротоксины стафилококков являются второй по распространенности причиной пищевых отравлений [1]. Показана активная роль энтеротоксинов в развитии аллергий [2]. Наиболее распространен энтеротоксин А – основной токсин, детектируемый у больных атопическим дерматитом [3]. Описанные методы определения энтеротоксинов в пищевых продуктах [4–7] как правило, требуют сложного приборного сопровождения, поэтому разработка новых методов, позволяющих обнаруживать энтеротоксины в количестве меньше токсической дозы, очень важны. Известно небольшое количество молекул, специфически и количественно взаимодействующих с энтеротоксинами, в том числе антитела и лиганды на основе естественных рецепторов энтеротоксинов [8, 9],

пептидные аптамеры [10] и аптамеры на основе нуклеиновых кислот [11]. Наиболее специфичными и при этом чувствительными являются антитела на основе вариабельных, антигенсвязывающих фрагментов [12]. Такие антитела получают с помощью фагового дисплея из библиотек фрагментов антител. Наиболее распространенными являются библиотеки Fab- или scFv-фрагментов антител, в которых антиген-связывающий фрагмент экспонируется на поверхности бактериофага M13 в составе белка р3 (мини-антитела в фаговом формате) [13, 14]. Ранее описана система детекции норовируса с использованием сэндвич-анализа при участии фага M13, экспонирующего в составе белка р3 функциональный пептид [15].

Использование бактериофагов осложняется их склонностью к образованию агрегатов, обладающих неспецифической сорбцией, что снижает чувствительность и достоверность иммуноанализа. Агрегаты могут быть образованы как самой фаговой частицей [16], так и рекомбинантными молекулами, включающими один из структурных компонентов бактериофага [17]. Данная статья посвящена разработке тест-системы определения энтеротоксина А стафилококков с использованием

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин, PBS – фосфатный солевой буферный раствор, PBST – PBS с 0.1% содержанием Tween 20, PBST-M – PBST с содержанием 2% сухого молока; scFv – одноцепочное мини-антитело, SEA и SEE – стафилококковый энтеротоксин А и Е, ИФА – иммуноферментный анализ, ф.ч. – фаговая частица.

Автор для связи (тел.: +7 (4967) 73-08-53; эл. почта: brovko@bibch.ru).

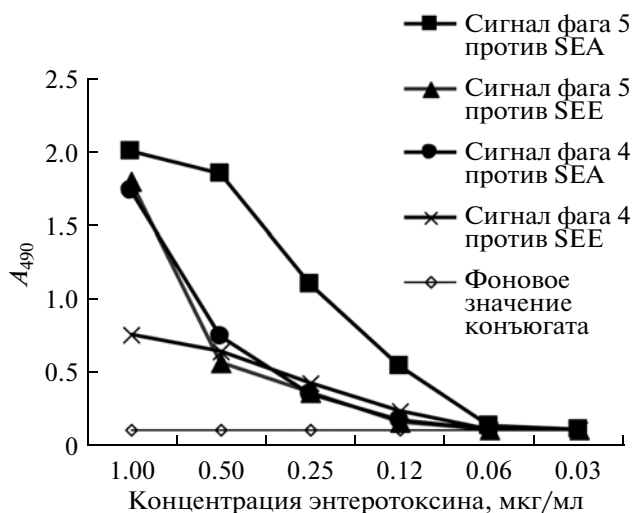


Рис. 1. Калибровочные кривые для определения предела детекции стафилококковых антигенов – энтеротоксинов А и Е (SEA, SEE) методом непрямого ИФА с помощью анти-SEA-фаговых антител 4 и 5.

ем одноцепочечных мини-антител к SEA в фаговом формате (фаговых антител).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение SEA в ИФА с помощью фаговых мини-антител. Фаги, несущие на поверхности мини-антитела к SEA, были получены ранее в нашей лаборатории с помощью стандартных методов аффинной селекции [18] из фаговой библиотеки мини-антител. Стафилококковый энтеротоксин А достоверно детектировался с помощью фагового SEA-мини-антитела 5. Предел детекции энтеротоксин А в случае анти-SEA-фага 5 составлял 125 нг/мл, анти-SEA-фага 4 – 250 нг/мл (рис. 1). Однако наблюдалась значительная перекрестная активность в отношении иных энтеротоксинов (рис. 2), что может объясняться значительной гомологией между токсинами, составляющим, например для SEA и SEE, 82%.

Определение SEA в сэндвич-ИФА. Для обнаружения энтеротоксинов стафилококков используются разнообразные методы. Несмотря на высокую чувствительность и специфичность методов, основанных на ПЦР, предпочтительными для анализа продуктов питания являются технологии непосредственного обнаружения энтеротоксинов как белков, учитывая их физико-химическую стабильность и способность сохранения токсичности. Из методов прямого определения чаще всего используются иммунохимические методы. При дифференциальном анализе белков одного семейства, как, например в случае энтеротоксинов разных стафилококков, использование монокло-

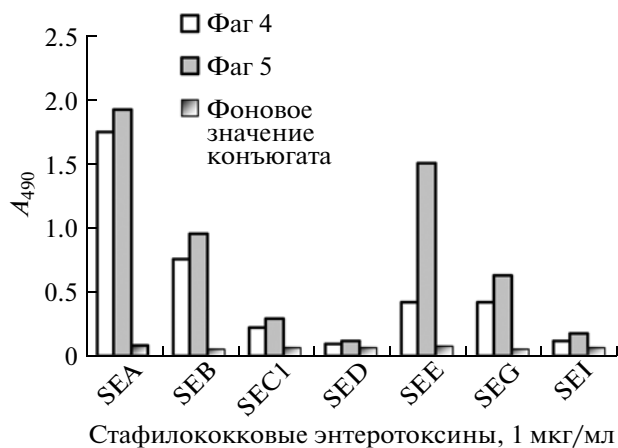


Рис. 2. Перекрестная активность фаговых анти-SEA-антител в отношении различных стафилококковых энтеротоксинов. Концентрация фаговых частиц в реакции составляла 10^{12} ф.ч./мл, концентрация антигенов – 1 мкг/мл.

нальных антител предпочтительно, так как они позволяют стандартизовать систему анализа и достичь необходимой специфичности при сохранении высокой чувствительности.

В качестве антител-захвата антигена – энтеротоксина А – использовали моноклональные антитела мыши к SEA, полученные ранее [4], которые проявляли высокую специфичность в отношении SEA и незначительную активность в отношении других исследованных энтеротоксинов. Эти антитела при подборе сэндвич-пар служили в качестве нижних – “улавливающих” антител, а в качестве верхних – детектирующих антител, применяли фаговые мини-антитела. Из проанализированных вариантов scFv два образовывали пары с пятью моноклональными антителами (рис. 3). Наилучший предел чувствительности наблюдался у пар, образованных мышинными моноклональными антителами 7 и 8 с анти-SEA-фаговым мини-антителом 5. В сэндвич-ИФА чувствительность составляла 6 нг/мл.

Полученный уровень чувствительности может считаться достаточным для детекции SEA, так как, по литературным данным [19] токсическая доза разных стафилококковых токсинов варьирует, но в среднем составляет 10 мкг/кг веса животного, такая доза вызывает рвотный эффект и диарею [20].

Оценка стабильности мини-антител при различных условиях хранения. С развитием технологии продукции рекомбинантных белков проблема их длительного хранения в стабильном активном состоянии становится все более актуальной. Для решения данной задачи часто используется метод лиофилизации. Однако в процессе замораживания – высушивания молекулы белка дегидратиру-

ются, а белок может денатурировать и агрегировать с потерей биологической активности. Для предотвращения инактивации белков в процессе лиофилизации и сохранения их в нативном, функционально-активном состоянии используется ряд реагентов и методов [21]. Известно, что сахара могут предотвращать агрегацию белка, поддерживая его в нативном состоянии. Согласно теории “стеклянного состояния”, предполагается, что стабилизаторы формируют аморфную фазу вокруг белковой молекулы, предотвращая денатурацию и агрегацию белка. Водородные связи между молекулой белка и молекулами воды при высушивании разрушаются, а молекулы сахаров замещают молекулы воды [22, 23].

В связи с тем, что мини-антитела в растворе нестабильны, что, вероятно, связано с агрегацией молекул, а приготовление свежего препарата осложняет работу, были подобраны условия длительного (до 6 месяцев) хранения фаговых мини-антител в лиофилизованном состоянии. С этой целью выделенные препараты фагов, экспонирующихся на своей поверхности scFv, лиофилизовали в присутствии различных стабилизирующих агентов: Tween 20, маннитол, сахароза, трегалоза, аргинин, BSA, и после 6 месяцев хранения определяли с помощью ИФА их функциональную активность (рис. 4).

Как видно из представленных рисунков, функциональная активность антител сохранялась лучше при лиофилизации в присутствии аргинина и сахаров: сахарозы и трегалозы. Аналогичные результаты с использованием сахаров были получены ранее для других белков [24]. В результате данного эксперимента были подобраны условия длительного хранения препарата мини-антител. Показано, что лиофилизация фаговых частиц с экспонированными на поверхности мини-антителами позволяет сохранять scFv в активном состоянии.

Микроскопия фагов. Для исследования стабильности фаговых препаратов в процессе хранения была проведена электронная микроскопия фагов.

Из представленных данных видно, что при замораживании/размораживании фаговых препаратов формировались кластеры (рис. 5а), что, вероятно, связано с термодинамической нестабильностью мини-антител, экспонированных на конце фаговой частицы. Однако такие кластеры не были доминирующими в препарате фага через 6 мес, в связи с чем его функциональная активность сохранялась в той или иной степени. Аналогичные агрегаты описаны ранее К. Фамм с соавторами, которые наблюдали агрегацию фагов в кислой среде [25]. В статье Л. Джесперс показано аналогичное поведение фагов при термической обработке [17].

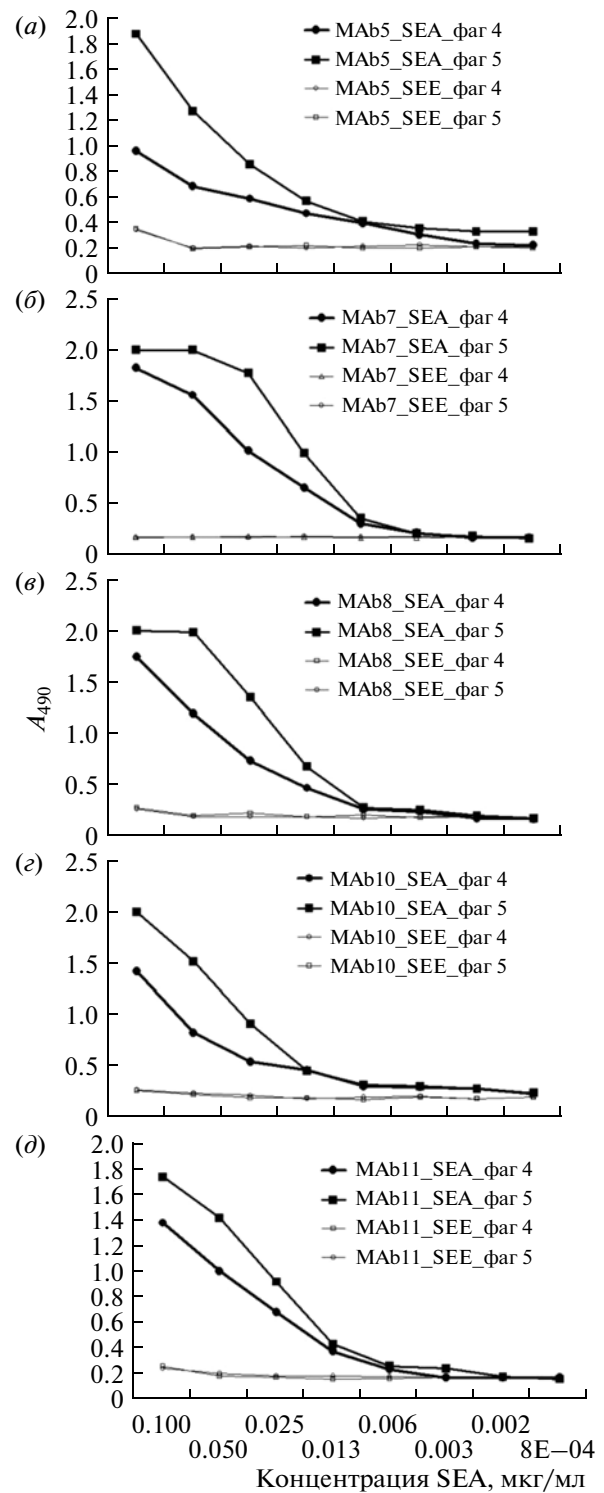


Рис. 3. Сэндвич-ИФА с использованием пар мышиных моноклональных антител и фаговых антител. Мышиные моноклональные анти-SEA-антитела использовали в качестве нижних захватывающих антител, фаговые анти-SEA-мини-антитела – в качестве верхних. (а) – пары MAb5/фаговое антитело 4, MAb5/фаговое антитело 5, (б) – пары MAb7/фаговое антитело 4, MAb7/фаговое антитело 5, (в) – пары MAb8/фаговое антитело 4, MAb8/фаговое антитело 5, (г) – пары MAb10/фаговое антитело 4, MAb10/фаговое антитело 5, (д) – пары MAb11/фаговое антитело 4, MAb11/фаговое антитело 5.

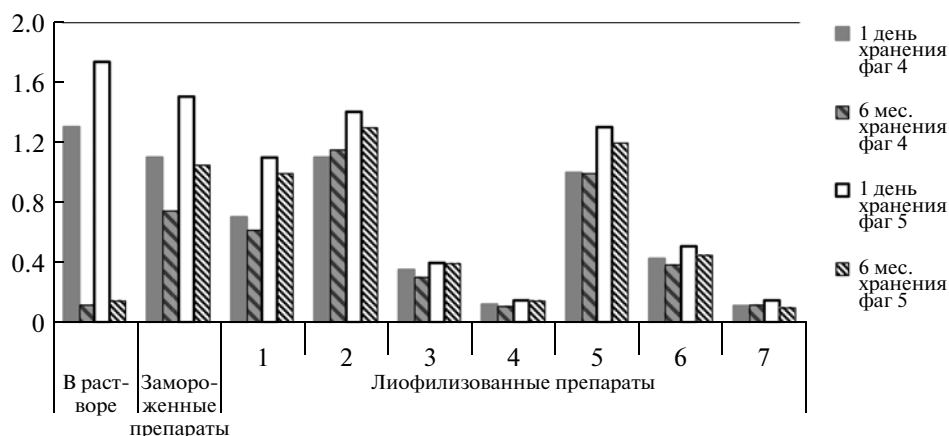


Рис. 4. Влияние условий хранения на функциональную активность фаговых анти-SEA мини-антител 4 и 5. Активность в ИФА определяли после одних суток и 6 мес хранения. 1–6 – препараты фагового антитела, лиофилизированные из раствора, содержащего: 1 – 0.1 М сахарозу; 2 – 0.1 М трегалозу; 3 – 0.1 М маннитол; 4 – 0.1% Tween 20; 5 – 0.1 М аргинин; 6 – 2% BSA; 7 – лиофилизация без добавок. Сравнение активностей проводили относительно препаратов фагов, хранящихся в растворе при 4°C и при –20°C.

В препаратах фагов, хранящихся в растворе при 4°C, образование таких агрегатов не наблюдалось, однако фаги формировали уплотненные конгломераты иного характера (рис. 5б). Вероятно, это служило причиной потери со временем функциональной активности мини-антител, хранящихся в растворах.

Из исследуемых ранее веществ, стабилизирующих препараты фагов для микроскопирования, нами были отобраны трегалоза и аргинин. Трегалоза была выбрана, так как она способствовала поддержанию функциональной активности фаговых мини-антител после лиофилизации, что было выявлено в ИФА. Аргинин известен своими уникальными свойствами, описанными в экспериментах по стабилизации белка [26–28].

Использование этих веществ предотвращало агрегацию фаговых частиц в препаратах. Как показала микроскопия фаговых частиц, четкие конгломераты при лиофилизации в присутствии аргинина и трегалозы (рис. 5в, г) не обнаруживались. Таким образом, данные, полученные в ходе электронной микроскопии, коррелировали с активностью лиофилизованных фаговых препаратов.

С. Грей с соавторами в качестве антител захвата использовали мини-антитела, экспонированные на дрожжевой клетке, а в качестве проявляющих – поликлональные антитела кролика. Метод показал свою эффективность при анализе антигена *Entamoeba histolytica* проточной цитометрией. Лиофилизованные антитела, экспонированные на дрожжевой клетке, сохраняли функциональную активность при хранении в течение длительного времени [29].

Описанный в настоящей работе метод при сохранении высокой чувствительности позволяет достичь специфичности определения, а антитела в фаговом формате могут быть хорошей альтернативой моноклональным антителам, получаемым традиционной гибридомной технологией, при более низкой стоимости.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы, использованные в работе, имели категорию ОСЧ или ХЧ. Конъюгат кроличьих поликлональных антител к белкам фага с пероксидазой хрена – анти-M13HRPO производства GE Healthcare (Великобритания).

Стафилококковые энтеротоксины-антигены были любезно предоставлены д.м.н. А.Н. Носковым (НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи).

Моноклональные антитела мыши против энтеротоксина А были получены в нашей лаборатории ранее [4], фаговые антитела были отобраны из фаговой библиотеки мини-антител scFv [30].

ИФА в фаговом формате. Токсины (антигены) сорбировали в лунки иммуопланшета (Corning – Costar, США) в концентрации 1 мкг/мл в 50 мМ карбонатном буфере, pH 9.6 (100 мкл на лунку). Для блокирования неспецифических участков связывания использовали PBST. Фаги с антителами против энтеротоксинов, в концентрации 10^{13} ф.ч./мл (концентрация фагов определялась спектрофотометрически – по поглощению при длине волны 269 нм) в растворе PBST, содержащем 2%-е сухое молоко (PBST-M), вносили в лунки ИФА-план-

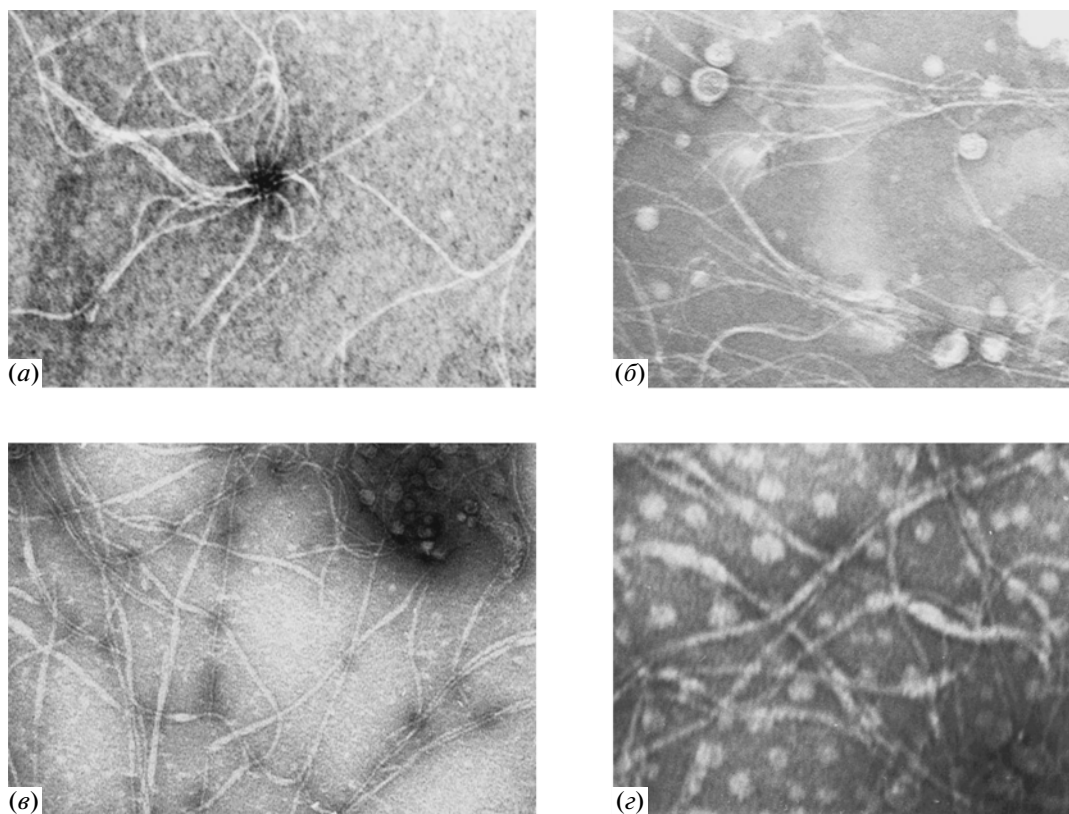


Рис. 5. Фотографии фаговых частиц, экспонирующих мини-антитело 5 при следующих условиях консервации: (а) нелиофилизированный препарат фага, хранившийся при -20°C и (б) при $+4^{\circ}\text{C}$; (г) препарат фага лиофилизированный в присутствии аргинина, (з) препарат фага лиофилизированный в присутствии трегалозы. Все препараты, кроме образца (б), хранились в течение 6 месяцев. (б) – хранился в течение трех дней при $+4^{\circ}\text{C}$.

шета в последовательных троичных разведениях и инкубировали 1 ч при 37°C . Детекцию связавшихся фаговых частиц проводили с использованием пероксидазного конъюгата кроличьих поликлональных антител к белкам фага – анти-M13HRPO (1 мкг/мл). В качестве субстрата использовали 4 мМ раствор орто-фенилендиамин (Sigma, США) в цитрат-фосфатном буфере (26 мМ лимонная кислота, 50 мМ Na_2HPO_4 , pH 5.0), содержащем 0.003% (по объему) H_2O_2 . После развития окраски реакцию останавливали добавлением равного объема 10% серной кислоты и определяли оптическое поглощение при длине волны 490 нм (Biorad Laboratories, США).

Сэндвич-иммуоферментный анализ. В лунки иммунопланшетов (Corning – Costar, США) вносили моноклональные антитела мыши в концентрации 5 мкг/мл в PBS. Сорбцию проводили в течение 1 ч при 37°C . В качестве блокирующего агента использовали PBST-M. На следующем этапе в лунки вносили SEA в концентрациях: 100, 50, 25, 12, 6 и 3 нг/мл. Мини-антитела в фаговом формате использовали в концентрации 10^{12} ф.ч./мл. Связав-

шиеся фаговые частицы детектировали с использованием конъюгата анти-M13HRPO (1 мкг/мл). В качестве хромофора использовали орто-фенилендиамин (Sigma, США). Поглощение измеряли при длине волны 490 нм (Biorad Laboratories, США).

Время инкубации на каждом этапе реакции составляло 1 ч при температуре 37°C . Все отмытки между этапами инкубаций осуществляли раствором PBST.

Лиофилизация фаговых препаратов. Препараты фаговых мини-антител были подготовлены в концентрации 10^{13} ф.ч./мл в буфере PBS и расфасованы по 100 мкл в криопробирки. В качестве стабилизирующих агентов использовали: 0.1 М сахароза, 0.1 М трегалоза, 0.1 М маннитол, 0.1 М аргинин, 0.1%-Tween 20, 2% BSA, растворенные в PBS.

Лиофилизацию препаратов проводили с помощью вакуумной роторной установки (Hetovac, Дания).

Сразу после лиофилизации и через 6 месяцев препараты проверяли на сохранение функциональной активности с помощью ИФА. Для этого образцы растворяли в 100 мкл воды, центрифугировали 5 мин 12000 g, осадок удаляли. Супернатант использовали для анализа. Для сравнения использовали препараты, хранящиеся в течение тех же сроков, что и лиофилизованные, при -20°C в растворе PBS с добавлением глицерина (до 10%), и не подвергавшиеся лиофилизации образцы, хранящиеся в растворе при 4°C .

Микроскопия фагов. В работе использовали электронный микроскоп BS-500 (Tesla, Чехословакия). Препараты фагов разводили до концентрации 10^{11} ф.ч./мл в PBS. Образцы сорбировали на медную сетку, промывали PBS, дистиллированной водой, контрастировали 4% уранилацетатом и цитратом свинца и анализировали. Съемку вели на фотопленку, негативы обрабатывали и анализировали после их оцифровки с помощью сканера Epson V700 (Seiko, Япония).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проведена в рамках гранта № 15-16-00020 по соглашению с Российским научным фондом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pepe O., Blaiotta G., Bucci F., Anastasio M., Aponte M., Villani F. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 7057–7062.
2. Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S. // Epidemiol. Infect. 2003. V. 130. P. 33–40.
3. Lee H., Kim S.M., Kim J.M., Oh B.M., Kim J.Y., Jung H.J., Lim H.J., Kim B.S., Lee W.J., Lee S.J., Kim D.W. // Ann. Dermatol. 2013. V. 25. P. 173–180.
4. Rubina A. Yu., Filippova M.A., Feizkhanova G.U., Shepeliakovskaya A.O., Sidina E.I., Bozjev Kh. M., Laman A.G., Brovko F.A., Vertiev Yu.V., Zasedatelev A.S., Grishin E.V. // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 8881–8889.
5. Shlyapnikov Y.M., Shlyapnikova E.A., Simonova M.A., Shepeliakovskaya A.O., Brovko F.A., Komaleva R.L., Grishin E.V., Morozov V.N. // Anal. Chem. 2012. V. 84. P. 5596–5603.
6. Orlov A.V., Khodakova J.A., Nikitin M.P., Shepeliakovskaya A.O., Brovko F.A., Laman A.G., Grishin E.V., Nikitin P.I. // Anal. Chem. 2013. V. 85. P. 1154–1163.
7. Simonova M.A., Petrova E.E., Dmitrenko O.A., Komaleva R.L., Shoshina N.S., Samokhvalova L.V., Valyakina T.I., Grishin E.V. // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. P. 6447–6452.
8. Sharma P., Postel S., Sundberg E.J., Kranz D.M. // Protein Eng. Des. Sel. 2013. V. 26. P. 781–789.
9. Sharma P., Wang N., Kranz D.M. // Toxins (Basel). 2014. V. 6. P. 556–574.

10. Temur E.I., Zengin A., Boyacı İ. H., Dudak F.C., Torul H., Tamer U. // Anal. Chem. 2012. V. 84. P. 10600–10606.
11. DeGrasse J.A. // PLoS One. 2012. V. 7:e33410.
12. Деев С.М., Лебедево Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габиров А.Г., Курчиичников М.П. // Успехи химии. 2015. Т. 84. Вып. 1. С. 1–26.
13. Petrenko V., Smith G. // Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery / Ed. Sidhu S. Taylor & Francis Group, LLC, 2005. P. 63–110.
14. Asadi-Ghalehni M., Ghaemmaghami M., Klimka A., Javanmardi M., Navari M., Rasaee M.J. // Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2015. V. 37. P. 274–279.
15. Hagström A.E., Garvey G., Paterson A.S., Dhamane S., Adhikari M., Estes M.K., Strych U., Kourentzi K., Atmar R.L., Willson R.C. // PLoS One. 2015. V. 10.
16. Zirpel K.N., Park E.J. // Macromol. Biosci. 2015. doi: 10.1002/mabi.201500046.
17. Jespers L., Schon O., Famm K., Winter G. // Nature Biotechnology. 2004. V. 22. P. 1161–1165.
18. Kontermann R.E. // Antibody Engineering / Ed. Kontermann R., Dubel S. Springer, 2010. P. 127–150.
19. Шепеляковская А.О., Семушина С.Г., Мурашев А.Н., Адамейко И.И., Бровко Ф.А. // Ж. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 5. С. 99–110.
20. Hennekinne J.A., De Buysse M.L., Dragacci S. // FEMS Microbiol. Rev. 2012. V. 36. P. 815–836.
21. Roy I., Gupta M.N. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2004. V. 39. P. 165–177.
22. Carpenter J.F., Crowe J.H. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 3916–3922.
23. Jain N.K., Roy I. // Protein Sci. 2009. V. 8. P. 24–36.
24. Han Y., Jin B., Lee S., Sohn Y., Joung J., Lee J. // Arch. Pharm. Res. 2007. V. 30. P. 1124–1131.
25. Famm K., Hansen L., Christ D., Winter G. // Mol. Biol. 2008. V. 376. P. 926–931.
26. Fursova K.K., Laman A.G., Melnik B.S., Semisotnov G.V., Kopylov P.Kh., Kiseleva N.V., Nesmeyanov V.A., Brovko F.A. // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2009. V. 877. P. 2045–2051.
27. Arakawa T., Ejima D., Tsumoto K., Obeyama N., Tanaka Y., Kita Y., Timasheff S. // Biophys. Chem. 2007. V. 127. P. 1–8.
28. Ito L.I., Shiraki K., Matsuura T., Okumura M., Hasegawa K., Baba S., Yamaguchi H., Kumasaka T. // Protein Eng. Des. Sel. 2011. V. 24. P. 269–274.
29. Gray S.A., Weigel K.M., Ali I.K., Lakey A.A., Capalunggan J., Domingo G.J., Cangelosi G.A. // PLoS One. 2012. V. 7. e32042. doi: 10.1371/journal.pone.0032042.
30. Улитин А.Б., Капралова М.В., Ламан А.Г., Шепеляковская А.О., Булгакова Е.В., Фурсова К.К., Аббасова С.Г., Волков С.К., Бровко Ф.А., Несмеянов В.А. // Доклады Академии наук. 2005. 405(4). С. 555–558.

Staphylococcal Enterotoxin A Detection with Phage Displayed Antibodies

**К. К. Fursova*., **, М. Р. Shchannikova*., **, А. О. Shepelyakovskaya*., **,
L. L. Pavlik***, F. A. Brovko*., **, #**

Phone: (4967) 73-08-53; e-mail: brovko@bibch.ru

*Ernst Institute of Animal Husbandry, Dubrovitsy settlement, Podolsk District, Moscow region, 142132 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Division, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

***Institute of Theoretical and Experimental Biophysics Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 3, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

A technique for detection of staphylococcal enterotoxin A was developed with sandwich enzyme immunoassay. Mouse monoclonal anti-SEA antibodies were used as capture antibodies, and phage displayed anti-SEA scFv were used as detection antibodies. The limit of detection was 6–12.5 ng/mL for different pairs of antibodies. Some conditions of phage displayed antibodies for storage in dissolved and lyophilized state were examined. It was shown the using of trehalose and arginine is preserved functional activity of phage displayed antibodies.

Keywords: staphylococcal enterotoxin A, phage displayed antibodies, sandwich enzyme-linked immunosorbent assay