

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**

Ставропольский  
научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора**

На правах рукописи

**ЕФРЕМЕНКО Дмитрий Витальевич**

**Совершенствование экспрессных методов индикации  
микобактерий туберкулеза**

**03.00.23 – биотехнология**

**03.00.07 - микробиология**

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
И.В. Жарникова  
Научный консультант:  
доктор медицинских наук,  
Д.А. Будыка

Ставрополь – 2005

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	<b>Стр.</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>ГЛАВА 1. Анализ эпидемиологической обстановки по туберкулёзу и современного состояния экспресс-диагностики его возбудителя (обзор литературы)</b>	14
1.1. Эпидемиологическая обстановка по туберкулезу в России.	14
1.2. Анализ современного состояния конструирования диагностических препаратов и индикации возбудителя туберкулеза.	22
1.3. Носители иммобилизованных систем твёрдофазного иммуноанализа	39
<b>СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	
<b>ГЛАВА 2. Материалы и методы</b>	48
2.1. Штаммы микроорганизмов, взятые в работу	48
2.2. Питательные среды, условия культивирования микроорганизмов	48
2.3. Объекты исследования	54
2.4. Получение антигенных комплексов микроорганизмов	54
2.5. Лабораторные животные, использованные в экспериментах	54
2.6. Методы иммунизации животных	55
2.7. Методы контроля антигенов и сывороток	55
2.8. Выделение иммуноглобулинов	55
2.9. Получение и контроль иммунофлуоресцирующих конъюгатов	56
2.10. Получение и контроль липосом	56
2.11. Получение и контроль иммуноферментных конъюгатов	56
2.12. Физико-химические методы	56
2.13. Иммунохимические методы анализа	57
2.14. Лиофилизация биологического материала	57

2.15. Характеристика реагентов, используемых для получения магно-иммуносорбентов	58
2.16. Методы математической и статистической обработки материалов	58
<b>ГЛАВА 3. Получение высокоактивного специфического биологического сырья (антигенов и антител) для конструирования диагностических препаратов</b>	59
3.1. Получение антигенных комплексов микобактерий туберкулёза	59
3.2. Получение специфической туберкулёзной сыворотки	64
<b>ГЛАВА 4. Получение иммуноферментных препаратов для экспресс-диагностики туберкулёза</b>	76
4.1. Получение иммунопероксидазного конъюгата	76
4.2. Получение липосом и липосомально-иммунопероксидазного конъюгата	81
<b>ГЛАВА 5. Получение туберкулёзных суспензионных диагностикумов</b>	91
5.1. Биотехнология изготовления латексного диагностикума	91
5.2. Разработка биотехнологии получения алюмосиликатного диагностикума	94
<b>ГЛАВА 6. Конструирование магнитоуправляемых иммуносорбентов для экспресс-диагностики микобактерий туберкулёза</b>	100
6.1. Разработка метода селективного концентрирования возбудителя туберкулёза на магноиммуносорбенте с последующей постановкой иммуноферментного анализа.	100
6.2. Разработка метода селективного концентрирования возбудителя туберкулёза на магноиммуносорбенте с последующей постановкой количественного иммунофлуоресцентного анализа	111
<b>ГЛАВА 7. Изучение диагностической ценности разработанных диагностикумов и тест-систем для выявления антигена</b>	

<b>возбудителя туберкулеза</b>	
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	118
<b>ВЫВОДЫ</b>	128
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b>	148
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ</b>	149
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b>	151

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,  
СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ**

Аг	- антиген
АТ	- антитело
г	- грамм
БСА	-бычий сывороточный альбумин
ИФА	- иммуноферментный анализ
КББ	- карбонат-бикарбонатный буфер
КИФА	- количественный иммунофлуоресцентный анализ
КМИС	- композиционные магноиммуносорбенты
к.р.с.	— крупный рогатый скот
ЛПС	- липополисахарид
мг	- миллиграмм
МИБП	- медицинские иммунобиологические препараты
мин	- минута
МИС	- магноиммуносорбент
м.к.	— микробные клетки
мкг	- микрограмм
мкл	- микролитр
мкм	- микрометр
мл	- миллилитр
МС	- магносорбент
МТБ	- микобактерии туберкулёза
нм	- нанометр
НТМ	- нетуберкулёзные микобактерии
НРИФ	- непрямая реакция иммунофлуоресценции
ООИ	- особо опасные инфекции
ПААГ	- полиакриламидный гель
ПАФ	- полный адъювант Фрейнда

ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПЭГ	- полиэтиленгликоль
РА	- реакция агглютинации
РАЛ	- реакция агглютинации латекса
РИА	- радиоиммунологический анализ
РИД	- реакция иммунодиффузии
РИФ	- реакция иммунофлуоресценции
pH	- отрицательный логарифм концентрации водородных ионов
РНГА	- реакция непрямой гемагглютинации
РТПГА	- реакция торможения пассивной гемагглютинации
РСА	- реакция суспензионной агглютинации
сек	- секунда
СтавНИПЧИ	- Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт
сут	- сутки
°C	- градус Цельсия
ТБ	- туберкулёз
ТИФМ	- твердофазный иммуноферментный метод
тыс.	- тысяча
ФИТЦ	- флуоресцеинизотиоцианат
ФСБ	- фосфатно-солевой буфер
ч	- час
ЭДТА	- этилендиамин-N,N,N,N-тетрауксусной кислоты динатриевая соль

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ**

Анализ сложившейся эпидемиологической ситуации показывает, что заболеваемость туберкулёзом в нашей стране носит характер эпидемии (Онищенко Г.Г., 2002; Пунга В.В., Капков Л.П., 1999). По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в промежутке времени с 2000 по 2020 гг. туберкулёзом в мире заболеют около 200 млн. человек, умрут около 35 млн. человек, будут инфицированы приблизительно 1 млрд. человек (WHO Fact Sheet, 2000). В связи с этим, одной из важных задач мировой медицины является разработка надёжных (активных и специфических), простых в использовании и дешёвых средств для быстрого выявления возбудителя в исследуемом материале.

В нашей стране при диагностике туберкулёза большое внимание уделяется культуральным методам, за рубежом – микроскопии мазка. Но оба эти метода имеют существенные недостатки. Культивирование с момента посева составляет три месяца, причём положительных результатов- 0,5-14 % (Клименко М.Т. с соавт., 1985; Клименко М.Т. с соавт., 1987; Литвинов В.И., 1996). При микроскопии мазка (флуоресцентной) наблюдается до 14 % положительных результатов (Канюк А.Н., 1995). Таким образом, данные методы не могут претендовать на роль основных в лабораторной диагностике туберкулёза. Известны способы диагностики туберкулёза с помощью эритроцитарных диагностикумов (Архангельский Н.И. с соавт., 1985), реакции агрегатагглютинации (Хоменко А.Г. с соавт., 1992), реакции агглютинации латекса, масс-спектропии (Маякова Т.И. с соавт., 1995), но данные методы трудоёмки и малоактивны. Существуют препараты для ПЦР-диагностики, но они отличаются значительной дороговизной и сложностью исполнения и поэтому распространения ещё не получили. В связи с этим, актуальным является разработка диагностических препаратов и методов исследований, обла-

дающих высокой специфической активностью, экспрессностью и информативностью.

## **ЦЕЛЬ И ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Цель исследования:**

совершенствование биотехнологий иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики микобактерий туберкулёза.

### **Основные задачи исследования:**

- отработать методические подходы по извлечению полноценных антигенных комплексов из микробных биомасс возбудителя туберкулёза и получить высокоактивные иммунные туберкулёзные сыворотки;
- разработать магнитные сорбенты с фиксированными на их поверхности антигенами гетерологичных штаммов для удаления из туберкулёзных иммунных сывороток неспецифических антител;
- отработать биотехнологию изготовления высокочувствительных и стабильных туберкулёзных липосомально-иммунопероксидазных конъюгатов;
- разработать эффективные способы получения суспензионных диагностикумов на основе полиакролеиновой (латексной) и алюмосиликатной матриц для реакций агглютинации;
- отработать биотехнологию аффинных сорбентов с магнитными свойствами для диагностики туберкулёза в экспрессных методах (иммуноферментном анализе - ИФА, количественном иммунофлуоресцентном анализе - КИФА);
- определить диагностическую ценность применения разработанных иммунобиологических препаратов на экспериментальном и клиническом материале.

### **Научная новизна работы.**

Полученные в результате исследований данные представляют интерес с точки зрения поиска путей извлечения полноценных специфических водорастворимых антигенных комплексов из микобактерий туберкулёза.

Разработан и применён аффинный магносорбент при проведении иммуносорбции гетерологичных антител из иммунных туберкулёзных сывороток, позволяющий получать специфичный препарат с сохранением его первоначальной активности, ускорять и упрощать процесс сорбции.

Впервые осуществлена научно-методическая разработка биотехнологии производства липосомальных туберкулёзных иммуноферментных конъюгатов, обладающих высокой чувствительностью и стабильностью.

Разработаны приёмы по предварительному селективному концентрированию микобактерий туберкулёза и их антигенов на магноиммуносорбентах (МИС) с последующим проведением экспрессных методов (ИФА, КИФА), позволяющие исследовать объекты внешней среды, материал от больных людей или животных, в том числе и сильно загрязнённые, неограниченного объёма пробы с низкой концентрацией микобактерий с чувствительностью, в 1000 и более раз превышающей общепринятые экспрессные методы.

Приоритетность ряда выполненных исследований подтверждена 2 патентами РФ на изобретения: № 2192265 «Способ получения комплекса фосфолипидов» (2002 г.) и № 2195296 «Способ получения ганглиозидов» (2002 г.).

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Основная теоретическая значимость проделанной работы заключается в определении научно-методических аспектов разработки иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики микобактерий туберкулёза, которые учитывают характерные особенности антигенной структуры микобактерий, свойства матриц биотической (липиды) и абиотической (органокремнезёмы, латексы) природы, методы конъюгации лигандов и маркёров, определяя направления последовательных стадий и операций биотехнологии производства диагностических туберкулёзных препаратов.

Разработаны научно-методические приёмы по получению полноценного антигенного материала из бакмасс микобактерий, высокоактивных им-

мунных сывороток, удалению из них перекрёстно реагирующих антител с помощью магнитных сорбентов. Оптимизация параметров иммобилизации антител обеспечила конструирование высокоактивных и специфических диагностических препаратов (иммуноферментных, суспензионных латексных и алюмосиликатных для реакции агглютинации, магноиммуносорбентных).

Разработанные методические подходы по ковалентной фиксации на поверхности мембраны липосом ферментов и иммуноглобулинов позволили повысить стабильность и увеличить срок годности диагностической системы без потери активности с сохранением каталитических свойств.

Сконструированные туберкулёзные магноиммуносорбенты в сочетании с экспрессными методами диагностики повышают их чувствительность до 50-100 микробных клеток в пробе, одновременно сокращая время проведения анализа до 1-1,5 часов за счёт селективного концентрирования на своей поверхности микобактерий, ускорения манипуляций и исключения ряда этапов в ходе анализов.

Результаты проведённых исследований по сочетанным методам магноиммуносорбции с экспрессными анализами и использование липосомальных препаратов дополняют новыми научными данными сведения о возможности использования иммобилизованных систем, способствующих стабильности, увеличению чувствительности методов и проведению эффективной детекции микобактерий туберкулёза.

Материалы научных разработок легли в основу двух методических рекомендаций: «Иммобилизация в липосомы веществ различной химической природы. Стерилизация и стабилизация липосом», утвержденных Главным Государственным санитарным врачом России Г.Г. Онищенко 06.04.2000 г., и «Применение магноиммуносорбентов для выявления микобактерий туберкулёза», утверждённых директором СтавНИПЧИ (протокол Учёного Совета СтавНИПЧИ №3 от 3.03.2005 г.).

На Федеральном уровне утверждены зам. главного санитарного врача РФ Е.Н. Беляевым технические условия (ТУ) 9154-00-01897080-2004 на фосфолипиды для получения липосом (письмо № 12 ФЦ/ 2514 А от 19. 08. 2004 г.). На учрежденческом уровне утверждены два регламента: на липосомальную основу для получения диагностических, лекарственных и косметических препаратов (протокол Учёного Совета СтавНИПЧИ № 4 от 20.04.2004 г.) и на тест-систему липосомально - иммунопероксидазную магноиммуносорбентную для выявления антигена туберкулёза иммуноферментным методом, утверждённую директором СтавНИПЧИ (протокол Учёного Совета СтавНИПЧИ № 3 от 3.03.2005 г.).

Материалы диссертации используются в лекциях и практических занятиях на курсах первичной специализации врачей по особо опасным инфекциям при СтавНИПЧИ по экспресс-диагностике туберкулёза и применению магноиммуносорбентных препаратов в мониторинге микобактерий.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Научно-методические подходы к получению высококачественного биологического сырья (антигенов и антител) для производства диагностических туберкулёзных препаратов. Получены водорастворимые антигены микобактерий, содержащие полный набор антигенных комплексов с высокой активностью (1:32-1:64 в реакции иммунодиффузии (РИД)). Подобрана производственная схема для получения иммунных сывороток с высокими титрами антител, основанная на оптимальной комбинации комплекса специфических антигенов и иммуномодуляторов.
2. Методические приёмы конструирования и применения аффинных сорбентов с магнитными свойствами при проведении иммуносорбции неспецифических антител из иммунных туберкулёзных сывороток. Разработанные сорбенты с иммобилизованными гетерологичными антигенами и метод сорбции позволили за один этап получить не только высокоспецифичную сыворотку, но и сохранить её первоначальную серологическую активность.

3. Научно-методические основы изготовления липосомально - иммунопероксидазного конъюгата для выявления антигена туберкулёза иммуноферментным методом. Имобилизованные на мембране липосом фермент и туберкулёзные иммуноглобулины повышают свою стабильность, что приводит к увеличению срока годности диагностической системы.
4. Биотехнология производства суспензионных латексных и алюмосиликатных диагностикумов, обеспечивающая высокую эффективность обнаружения микобактерий туберкулёза в экспериментальных и клинических условиях. Разработанные препараты по чувствительности аналогичны традиционным методам, но превосходят их по простоте изготовления и экспрессности (постановка и учёт результатов реакции с алюмосиликатным диагностикумом 1 - 3 мин).
5. Научно-методические основы биотехнологии изготовления твёрдофазных микрогранулированных аффинных магноиммуносорбентов для избирательного концентрирования микобактерий и их использования в экспрессных методах (ИФА, КИФА). Разработанные препараты позволяют повысить чувствительность более чем в 1000 раз при увеличении вероятности выявления микобактерий за счёт селективного концентрирования антигена на антителе, находящемся на твёрдой матрице.

### **Апробация работы.**

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская микробиология XXI века» (Саратов, 28-30 сентября 2004); 1-й Всероссийской конференции «Медицинские иммунобиологические препараты для профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций» (Москва, 10-11 октября, 2004); региональном обществе эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Ставрополь, 17 февраля 2005); научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпид.надзора за природно-очаговыми и особо опасными инфекциями в регионе Северного Кавказа» (Ставрополь, 14 – 16 апреля

2005), на VI Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Санитарная охрана территорий государств участников содружества независимых государств: проблемы биологической безопасности и противодействия биотерроризму в современных условиях» (Волгоград, 2005).

### **Публикации.**

Основное содержание диссертации отражено в 10 опубликованных научных работах (2 патента на изобретение, 1 депонированная работа и 7 трудов в научных сборниках).

### **Структура и объём работы.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы и приложений. Она изложена на 178 страницах, содержит 18 таблиц и 19 рисунков. Список литературы включает 178 отечественных и 99 зарубежных литературных источников.

## ГЛАВА 1. Анализ эпидемиологической обстановки по туберкулёзу и современного состояния экспресс-диагностики его возбудителя (обзор литературы)

### 1.1. Эпидемиологическая обстановка по туберкулезу в России.

Правительство РФ утвердило Перечень социально значимых и опасных для окружающих заболеваний. К первой группе отнесён туберкулёз наряду с такими заболеваниями как гепатит В, С, СПИД и некоторые другие (Алексеев П., 2004). В целях законодательного регулирования мероприятий по борьбе с инфекционными заболеваниями в 2001 г. принят Федеральный закон «О предупреждении распространения туберкулёза в РФ». Эпидемиологическая обстановка по туберкулёзу остаётся напряжённой. Туберкулёз – одна из главных причин высокой заболеваемости, хронизации и смертности, особенно в развивающихся странах (Петрухина М.И., Русакова Е.В., Ющенко Г.В., 2003; Murray C.J.L, Styblo K, Rouillon A. ,1990; Sudre P, Ten Dam H.G, Kochi A.,1992). В соответствии с данными ООН, 1/3 населения инфицирована МТБ (микобактериями туберкулёза), каждый год выявляется 8 млн. случаев активного туберкулёзного (ТБ) процесса, ведущего к смертности 3 млн. человек (Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. ,1994). В России в 2004 г. зарегистрировано около 102,9 тыс. больных с установленным впервые активным туберкулёзом. Показатель заболеваемости – 71,7 на 100 тыс. населения. По сравнению с 2003 г. отмечается рост заболеваемости на 3,3 % (Ильин И.А., 2005).

Туберкулёз человека вызывается чаще всего МТБ (более 90 % случаев туберкулёзной инфекции). Род *Mycobacterium* включает более 50 видов и подвидов микобактерий – патогенных (*M. bovis*, *M. avium*, *M. kansasii* (фотохромогенные), *M. intracellulare* (нефотохромогенные) и некоторые другие), условно патогенных и сапрофитов, широко распространенных в природе. Не менее 25 из них играют важную роль в патологии человека, являясь возбудителями туберкулёза, микобактериозов (нетуберкулёзных кислотоустойчивых микобактерий), проказы (Борисов Л.Б., 2002). Кроме этого

известны кислотоустойчивые сапрофиты, не вызывающие заболевания человека. К нетуберкулёзным микобактериям (НТМ) относится и язва Бурули (ЯБ), вызываемая *M. ulcerans*. До сих пор как эпидемиология ЯБ изучена недостаточно, так и резервуары и способы передачи данного заболевания. В природе свободно живущие фагоцитирующие простейшие играют важную роль как возможные естественные хозяева и резервуары для микобактерий, включая *M. ulcerans*, что необходимо также учитывать. В 1999 впервые заподозрили водяное насекомое (Hemiptera) как пассивный резервуар возбудителя ЯБ. Эта находка позволила предполагать возможную роль насекомых в передаче НТМ от животных к человеку (Portaels F., 2003).

Географические и климатические изменения могут оказывать влияние на эпидемиологию НТМ. F.Portaels (2003) продемонстрировал положительную связь между ПЦР(+) образцами из окружающей среды и частотой ЯБ на соответствующей территории. Пространственно-временные исследования окружающей среды важны и могут иметь ценность при выявлении возбудителя ЯБ и НТМ у человека и животных. Микроскопически они неотличимы от *Mycobacterium tuberculosis*.

Патогенность туберкулёзных микобактерий связана с прямым или иммунологически опосредованным повреждающим действием липидов. Их действие выражается в развитии специфических гранулём и поражении тканей. Для вирулентных штаммов характерно наличие так называемого корд-фактора- гликолипида, состоящего из трегалозы и димиколата. Он разрушает митохондрии клеток инфицированного организма, тем самым нарушая функцию дыхания. Патогенные для людей возбудители могут вызывать местные и генерализованные туберкулёзоподобные процессы. Частота выделения и этиологическое значение указанных микобактерий зависит от их распространенности и состояния антиинфекционной защиты макроорганизма. Среди клинических форм могут быть: лёгочные поражения, инфицирование ран, поражение кожи, подкожной клетчатки, лимфатических узлов, костей, суста-

вов, почек, а также системные инфекции (Воробьёв А.А., Кривошеин Ю.С., Ширококов В.П., 2003). Весьма сходными с микобактериями туберкулёза по морфологии и антигенному составу являются микроорганизмы рода *Nocardia*. Различные виды нокардий обладают разной степенью патогенности для человека и животных. Больные нокардиозом незаразны для окружающих. В России описаны единичные случаи заболевания. В основном нокардиоз регистрируется в странах тропического и субтропического поясов (Коротяев А.И., Бабичев С.А., 2002). Палочки BCG, используемые в качестве вакцины при туберкулёзе, имеют сходные свойства с *M. bovis*, исключая их низкую патогенность (Dankner WM, Davis C.E., 2000; Ashford D.A., Whitney E, Raghunathan P. et al., 2001). У возбудителей микобактериозов возможны перекрёстные серологические реакции с микобактериями туберкулёза. Так, у *M. kansasii* и *M. tuberculosis* имеются общие антигены, а у инфицированных *M. kansasii* отмечают положительную реакцию Манту. Схожесть клинической картины и лечения при проявлении микобактериальных инфекций подразумевает, что многие лаборатории их не идентифицируют в полной мере (Gangadharam P.R.J., Droubi A.J., 1981; O'Reilly LM, Daborn C.J., 1995). Тем не менее, очень важно идентифицировать возбудителей для дальнейших эпидемиологических исследований по выявлению резервуаров и правильному лечению больных.

До 1978 г. в России отмечалось снижение заболеваемости туберкулёзом за счёт улучшений социальных условий и внедрения комплекса лечебно-профилактических мероприятий. Последующие годы (до 1991) характеризовались дальнейшим снижением заболеваемости до порога эпидемического благополучия, определённого ВОЗ - 30 случаев на 100 тыс. населения. Особенно быстро показатели снижались среди детей и подростков. Начиная с 1992 г., эпидемическая ситуация по туберкулёзу резко ухудшилась во всём мире, наблюдается рост заболеваемости как среди взрослых, так и среди детей (Журавлёв М.В., Арсенина Л.В., Виноградова И.Л. с соавт., 2002; Русако-

ва Е.В., Иваненко Г.П., Иванова И.Н. с соавт., 2002). В период с 1997 по 1999 гг. в России заболеваемость, вызываемая МТБ, возросла. В 2000 г. этот показатель увеличился по сравнению с уровнем 1991 г. в 2,7 раза (Шешуков П.Ф., Готовский Ю.В., 2002) и лишь в 2000-2002 гг. стабилизировался на высоком уровне. В последние годы резко возрос показатель инфицированности детей, который в 2000 г. составил 2,5 %, тогда как при благополучной ситуации он не превышал 0,1-0,3 % (Онищенко Г.Г., 2003). Наблюдаемое в настоящее время в РФ прогрессирование заболеваемости туберкулёзом связано с очевидным снижением уровня жизни человека и сопутствующим дисбалансом в питании; многочисленными стрессами и наплывом беженцев из других республик бывшего СССР (их заболеваемость туберкулёзом достигает 700 случаев на 100 000 населения), особенно чеченских беженцев (Jakubowiak W., Komourzaeyev B., Dara M. et. al. 2003); увеличением количества эмигрантов (A. G. Miranda, 2003); ростом алкоголизма и наркомании; неудовлетворительным условием содержания заключённых (хотя, несмотря на напряжённую эпидситуацию в местах лишения свободы, мероприятия, направленные на предупреждение и раннюю детекцию ТБ, включающие туберкулинодиагностику, флюорографию 2 раза в год, химиотерапию, позволили уменьшить случаи выявления ТБ среди юношей в 6,5 раз (Rakisheva A., Erkenova G., Kasenova L., 2003); скученностью населения в следственных изоляторах, лагерях беженцев; увеличением числа лиц “без определённого места жительства”; прекращением в 90 –х годах предоставления больным с открытой формой туберкулёза изолированной жилой площади (заболеваемость контактных в очаге достигает 700 на 100 000 населения); недостаточным количеством современных препаратов для больных; низкой материально-технической базой многих противотуберкулёзных учреждений (Онищенко Г.Г., 2003). С другой стороны, усиливается “активность” возбудителя, обусловленная, очевидно, вытеснением естественных конкурентов в результате применения антимикробных средств.

Во всех странах ежегодно регистрируют 8-10 млн. случаев инфицирования. Не меньшее значение имеет увеличение количества лиц с хроническими заболеваниями, сопровождающимися нарушениями иммунитета (Покровский В.И., Позднеева О.И. М., 1998).

Эпидемический процесс при туберкулёзе характеризуется наличием двух форм – антропонозной и зоонозной. В первом случае источником инфекции служит человек, заболевание вызывается *Mycobacterium tuberculosis*, во втором случае – животные (крупный рогатый скот), птицы, заболевания которых вызываются *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium avium*. В отличие от других зоонозных инфекций, при туберкулёзе человек не является эпидемическим тупиком, от него возможно дальнейшее распространение инфекции антропонозным путём (Коротченко С.И., 1999; Фролова Ф.Н., Кулаков И.М., Зайнутдинова Н.Г., Фатыхова Р.Х., 2002). Особенностью при туберкулёзе является убиквитарное распространение и широкая циркуляция возбудителя среди населения, многообразие механизмов, путей и факторов передачи: при антропонозном - ведущий аспирационный механизм с воздушно-капельным и воздушно-пылевым путями передачи, возможен и контактный механизм с контактно-бытовым путём передачи; при зоонозном туберкулёзе преобладают алиментарный и контактно-бытовой пути заражения. Эпидемиологический процесс при туберкулёзе характеризуется высокой заболеваемостью у определённых групп населения, особенно среди лиц с вторичными иммунодефицитами, в том числе ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом, в закрытых коллективах детей и взрослых. Повышается уровень заболеваемости среди медицинских работников, особенно противотуберкулёзных учреждений, среди работников неблагополучных по туберкулёзу животноводческих и птицеводческих хозяйств, среди лиц, имеющих профессиональные вредности (шахтёры, работники предприятий с повышенным пылеобразованием и др.).

Зависимость заболевания туберкулёзом от социальных факторов обусловлена усилением миграции с территорий, неблагополучных по туберкулёзу, снижением уровня жизни и ухудшением питания населения (в основном неработающей части населения), демографическими сдвигами в сторону старения населения (Покровский В.И., Позднеев О.И. М., 1998; Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Дергачёв А.В. с соавт., 2003).

Для возбудителя туберкулёза характерны относительно быстрое формирование лекарственной устойчивости, появление лекарственно-зависимых форм, способность к трансформации в L-формы, фильтрующиеся и оскользящие формы, персистирующие внутри макрофагов, а также некультивируемые формы с возможностью реверсии всех этих образований микобактерий в исходное состояние.

Клинические проявления туберкулёза имеют ряд особенностей, заключающихся в множественной локализации патологического процесса (лёгочные и внелёгочные формы) с преимущественным поражением дыхательной системы (до 90 % и более), невозможности определения точных сроков инкубационного периода (минимальным сроком инкубации считается 2 нед. до появления в лёгких специфических Т-лимфоцитов). Установить же максимальный срок инкубации при инфекции, развивающейся медленно и клинические признаки при которой возникают постепенно, достаточно сложно. Для туберкулёза характерны хронический характер инфекционного процесса при отсутствии ранней диагностики и лечения, преобладание клинически выраженных форм у подростков и лиц молодого возраста, первичное инфицирование преимущественно в детском возрасте, трудность раннего выявления заболевания у людей всех возрастов из-за полиморфности клинической симптоматики, отсутствия настороженности медицинских работников, а также нарушения регулярности профилактических осмотров.

В патогенезе туберкулёза возможны эндогенный и экзогенный механизмы развития инфекционного процесса. Экзогенный механизм проявляется

чаще у взрослых при повторном инфицировании (суперинфекции), как правило, лекарственно-устойчивыми микобактериями. При эндогенном механизме развитие туберкулёза происходит в результате реактивации (реверсии) изменённых форм микобактерий, сохранившихся в остаточных очагах первичной туберкулёзной инфекции. Активация туберкулёзного процесса может происходить в разные сроки, иногда через длительное время от момента первичного заражения.

Восприимчивость человека к туберкулёзу всеобщая, хотя и неабсолютная. Из контактировавших с бациллярными больными инфицируются в течение года 40-50 чел., из которых заболевают 20-40 %. При этом отмечается неодинаковая восприимчивость к данной инфекции в разных возрастных группах: низкая- у детей 1-2 лет, 10-11 лет и у взрослых 30-50 лет (зрелый возраст); высокая- у детей раннего возраста, в препубертатный и пубертатный периоды (12-16 лет), у лиц молодого возраста и пожилых людей. Формирование противотуберкулёзного иммунитета происходит, как правило, на фоне инфицирования («нестерильный иммунитет») (Петрухина М.И., Русакова Е.В., Ющенко Г.В., 2003).

В структуре клинических форм туберкулёза стало больше пациентов, страдающих распространенными, запущенными и осложнёнными формами, а также больных, выделяющих лекарственно-устойчивые микобактерии туберкулёза, снизилась также эффективность лечения больных туберкулёзом (Шевченко Ю.Л. Приказ МЗ РФ № 109 от 21.03.2003).

Появление остро прогрессирующих форм туберкулёза способствует высокому уровню инфицирования туберкулёзом детского населения и увеличению числа заболевших детей, отмечаемому с 1990 г. (1989 г. – 7,4 на 100000 детского населения, 1990 г. - 7,8; 1997 г. - 14,7; 2001 г. - 18,6). Особую тревогу вызывают постоянно сохраняющиеся в течение ряда лет высокие показатели заболеваемости детей туберкулёзом в Чеченской, Ингушской,

Северо-Осетинской республиках, а также в республиках Алтай, Дагестан, Тыва и Бурятия.

Показатель заболеваемости туберкулёзом детского населения свидетельствует о сохранении неблагоприятной общей эпидемической ситуации по туберкулёзу в стране. При этом структура впервые выявленного туберкулёза у детей подтверждает в целом удовлетворительное качество работы общей лечебной и противотуберкулёзной служб по активному выявлению и профилактике заболевания. Несмотря на ухудшение общей эпидемиологической ситуации в стране, структура фтизиопедиатрической службы была сохранена в прежнем объёме в большинстве регионов России. Охват специфической вакцинацией БЦЖ детей ежегодно составляет до 95 %, туберкулинодиагностикой-85 %. Доля впервые выявленных профилактическими методами больных детей составляет более 70 %. Эти подходы обеспечивают диагностику форм заболеваний, требующих проведения коротких курсов химиотерапии, позволяющих достичь быстрого излечения без остаточных изменений. При росте уровня общей заболеваемости детей в России в течение 10 лет встречаются единичные случаи фиброзно-кавернозного туберкулёза. Из 4712 заболевших детей 4003 ребёнка имели поражения органов дыхания. Уменьшается число случаев туберкулёзного менингита, его доля в структуре заболеваемости туберкулёзом составила 0,9 % в 2001 г. Показатель смертности детей от туберкулёза в России колеблется в последние два десятилетия от 0,6 до 0,11 % на 100 000 детей. Наиболее высока смертность у детей первых 2 лет жизни, она в 10 раз превышает общий показатель (Аксёнова В.А. , 2003).

С 1996 г. наблюдался умеренный рост туберкулёза среди больных ВИЧ-инфекцией. Диагностировали эту сочетанную патологию главным образом на ранних стадиях ВИЧ – инфекции более чем в 50 % случаев в противотуберкулёзных учреждениях. В настоящее время ситуация начала изменяться. Это связано с тем, что у заразившихся ВИЧ 5 лет назад уже начинают развиваться поздние стадии ВИЧ - инфекции и, соответственно, иммуноде-

фицит. Если проецировать такое развитие ситуации и дальше, то к 2007 г. число больных ВИЧ-инфекцией и туберкулёзом составит более 30 тыс. (Фролова О.П., 2003).

Государственная система мониторинга туберкулёза действует в России с 1997 г. на основе приказа Минздрава России № 193 от 13.07.97. Базы данных и программное обеспечение, установленные в более чем 40 административных территориях РФ, обеспечивают в настоящее время эффективный эпидемиологический мониторинг и контроль деятельности фтизиатрической службы (Белиловский Е.М., 2003).

В настоящее время НИИ туберкулёза и фтизиопульмонологии сотрудничает с зарубежными учреждениями по прикладным и фундаментальным исследованиям, по изучению механизмов возникновения лекарственной устойчивости и путей распространения туберкулёза, разработке методов ускоренного определения чувствительности МТБ к химиопрепаратам, иммуногенетике туберкулёза с целью изучения молекулярно-генетических механизмов резистентности макроорганизма туберкулёзной инфекции (Ерохин В.В., 2003).

В связи со своеобразием эпидемиологии, клиники и диагностики туберкулёза, эпидемиологический надзор должен осуществляться с учётом его особенностей (Петрухина М.И., Русакова Е.В., Ющенко Г.В., 2003). ВОЗ принимает участие во внедрении программы по контролю над туберкулезом на территории РФ с 1994 г. Сегодня 27 субъектов РФ используют рекомендации ВОЗ (Kluge H., Jakubowiak W., Pashkevich D. et.al., 2003).

## **1.2. Анализ современного состояния конструирования диагностических препаратов и индикации возбудителя туберкулеза.**

На приоритетном месте медицинской биотехнологии стоят вопросы разработки и совершенствования технологий изготовления биопрепаратов с

целью повышения их активности, чувствительности, специфичности, экспрессности при диагностике туберкулёза у больных людей и выявлении возбудителя в объектах внешней среды.

Для конструирования высокоактивных диагностических препаратов необходимо получить качественный антигенный и антительный материал. При изолировании антигенного материала микобактерий, представляющего собой сложные комплексы, содержащие протеины, полисахариды, липиды, фосфатиды, необходимо более полное извлечение интересующих специфических компонентов с сохранением их биологических и антигенных свойств. Для перевода антигенов в растворимое состояние применяют экстракцию трихлоруксусной кислотой, солевыми растворами, фенолом, эфиром, хлороформом, ацетоном и т.д. Получаемые при этом экстракты имеют различные физико-химические, иммунохимические свойства и спектр антигенов. При анализе литературных данных по методам выделения антигенных комплексов из микробных клеток привлекли внимание сообщения Н.А.Бельской с соавт. (1972), В.И.Вейнבלата с соавт. (1972), в которых показано, что наиболее сложным макромолекулярным составом обладали водно-солевые экстракты. Многими исследователями для извлечения антигенных компонентов из микробной клетки использовались различные методы её разрушения: физический, химический, механический и др. Эффективными методами разрушения микробной клетки является ультразвуковая и механическая дезинтеграция (Фихте Б.А., 1972; Афанасьев Е.Н., 1986), так как под их воздействием наступает, прежде всего, разрушение структуры клеток микробов, а изменения химических веществ, находящихся в них, происходят гораздо медленнее, что обеспечивает возможность получения различных нативных антигенных комплексов (Благовещенский В.А. с соавт., 1961).

Специфичность иммунологических реакций находится в прямой зависимости от активности и специфичности антитела, используемого для приготовления диагностического препарата (Скачек Д.В., 1984; Алексеев В.В. с со-

авт. 1987). Для получения сывороток описаны различные схемы иммунизации животных (Шаханина К.Л., 1977; Чибисова В.А., 1975; Тюменцева И.С. с соавт., 1994 г; Rowe D.S., 1970; Lachman P.J., 1970 и др.). Антисыворотки, приготовляемые к различным антигенам, испытывают на активность и специфичность методами кольцепреципитации, электрофореза и иммуноэлектрофореза, преципитацией в агаре по Оухтерлони, реакциями агглютинации (РА), непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментного анализа (ИФА) и т.д.. При наличии перекрестных реакций антисыворотки истощают (Шаханина К.Л., 1981; Смирнов В.В., 1980; Кузовлева А.А., Шаханина К.Л., 1982; Beuntner E.H. et al., 1970; Ansari A.A. et al., 1981). Лучшие результаты получают при удалении нежелательных антител нерастворимыми иммуносорбентами. Применяют иммуносорбенты, полученные путем присоединения специфического антигена к носителю (целлюлозе, агарозе, сефарозе и др.), либо "сшивкой" специфического антигена. Такие иммуносорбенты обладают прочной ковалентной связью антигена с матрицей и получаются при взаимодействии реакционноспособных функциональных групп биополимеров со специально подобранными бифункциональными соединениями.

Попытки истощения сывороток при использовании в качестве адсорбентов микробных клеток, широко применяемых в сывороточном производстве (Карпов С.П. с соавт., 1976; Смирнов В.В. с соавт., 1980; Пекшев А.В., Елагин Г.Д., Пятков В.А., 1998), приводят к существенной потере специфической активности нативных сывороток, при их частичном насыщении антигенным материалом. При этом процесс адсорбции иммунной сыворотки корпускулярными антигенами очень трудоемок и требует приготовления большого количества биомассы. Значительные преимущества перед названными сорбентами имеют твердофазные иммуносорбенты. При их приготовлении отпадает необходимость получения большого количества биомассы микроорганизмов штаммов-адсорбентов, существует возможность длительного их использования после проведения регенерации и, что самое главное, в процес-

се адсорбции происходит незначительное снижение специфической активности сывороток при упрощении манипуляций (Лопаткин О.Н. с соавт., 1983). Тем не менее, метод иммуносорбции имеет и недостатки, связанные со сложностью подготовки иммуносорбентов, с использованием канцерогенных, дорогостоящих импортных реактивов, с недостаточной сорбционной емкостью сорбентов.

Чувствительность иммунометодов зависит, прежде всего, от активности антител, на основе которых они изготовлены. Чаще всего используют иммуноглобулины класса G, для выделения которых из сыворотки существует много способов: аффинная хроматография, высаливание сернокислым аммонием (Таран И.Ф., Лопаткин О.Н., 1985; O'Berry P.A., 1964; Lenis V.J. с соавт., 1964), осаждение каприловой кислотой (Steibuch, Andran, 1969), полиэтиленгликолем (Polson A. с соавт., 1964), риванолом (по Корн, 1977), этиловым спиртом (Табачков П.К с соавт., 1962; Носков Ф.С., 1969) и т.д. Освобождение иммуноглобулинов от основного количества балластных белков (главным образом от альбумина) позволяет снизить неспецифические реакции.

Каждый из методов выделения иммуноглобулинов имеет свои преимущества и недостатки. Удаление солей, используемых при фракционировании белков, необходимо проводить полностью, так как загрязнения выделенных глобулинов даже небольшим количеством сульфата аммония мешают точному определению количества белка и дальнейшей его конъюгации с красителем или ферментом. Сульфатно-риваноловый метод обеспечивает эффективное удаление балластных веществ при очистке иммуноглобулинов (Водолазова А.М., Никитина Л.Н., 1981). Метод их выделения с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) является эффективным, так как ПЭГ хорошо осаждает белки, обладает селективностью, более специфичен при осаждении белков различной природы, чем сульфат аммония. При фракционировании

иммуноглобулинов каприловой кислотой выделяется наиболее чистая фракция иммуноглобулинов класса G.

Только при чётко подобранном антигенном материале, эффективной схеме иммунизации, отработанном для каждого конкретного случая методе выделения иммуноглобулинов, возможно получение высокоактивных диагностических препаратов.

В настоящее время диагностика ТБ недостаточно эффективна. Так, например, основными методами диагностики ТБ медиастинальных лимфоузлов, сопровождающегося интоксикационным синдромом в сочетании с кальцинацией лимфоузлов и продуктивным кашлем, являются рентгенологический и бронхоскопический (Nikolayeva O., Shpak O., 2003).

При диагностике туберкулёза до сих пор на приоритетном месте находятся бактериоскопия и культуральный метод. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Бактериоскопия позволяет быстро получить результаты анализа, однако недостаточно чувствительна, а результаты культурального метода из-за длительности сроков культивирования микобактерий не отражают настоящую ситуацию по бактериовыделению (Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В., Васильева И.А. с соавт., 2004). Идентификация комплекса МТБ биохимическими тестами требует большого количества времени и наличия достаточного количества выросших колоний. На основании наличия внутривидовых различий результаты тестов могут разниться, поэтому необходимо проводить их в комплексе. Например, для идентификации МТБ необходимы, по меньшей мере, 4 биохимических теста - аккумулярование ниацина, редукция нитратов, каталазы и толерантность к парааминобензойной кислоте (Kent P.T., Kubica G.P., 1985). Стоимость этих анализов выше стоимости ПЦР в два раза, а время, необходимое для их проведения, составляет около 28 дней.

Газо-жидкостная хроматография является быстрым и действенным методом идентификации МТБ, для которого необходима чистая культура и

определённое количество бактерий, формирующихся при трёх неделях роста (Butler W.R., Jost K.C., Kilburn J.O., 1991; Thibert L., Lapierre S., 1993; Duffey P.S., Guthertz L.S., Evans G.C., 1996; Zerbini E., Cardoso M.M., Sequeira M.D. et al., 1999).

Стремительное развитие биотехнологии в последние годы привело к появлению многочисленных новых методов исследования, однако, продолжает широко применяться хорошо известная реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА), заключающаяся в том, что эритроциты, связавшие серологически активный компонент, приобретают свойства агглютинироваться гомологичным серологически активным анти-компонентом. Такой метод выявления первичного взаимодействия антиген-антитело обладает весьма высокой чувствительностью. Эти реакции находят все большее применение в диагностике различных заболеваний, изучении иммунологической прослойки населения, исследовании антигенной структуры различных микроорганизмов и т.д. Эритроцитарные диагностикумы до сих пор привлекательны по себестоимости, доступности сырья, простоте производства и применения.

В качестве антигена для РНГА применяют экстракт туберкулиновых микобактерий или очищенный туберкулин, которыми сенсibilизируют эритроциты. Диагностическое значение имеет положительная реакция с сыворотками больных 1:8 и выше. Положительные результаты регистрируются у 70-90 % больных туберкулёзом (Воробьёв А.А., Кривошеин Ю.С., Ширококов В.П., 2003).

Суспензии - распространённые микрогетерогенные системы, которые могут быть получены различными способами, например, конденсационными, дисперсными и т.д. (Хмельницкий Р.А., 1988). Адсорбция лигандов на данных системах зависит от химического строения сорбентов и соотношения фракций лиганда (Адамов А.К., 1965; Адамов А.К., Агафонов В.И., 1969). При изучении закономерностей адсорбции иммунных антител установлено,

что они адсорбируются органическими соединениями, содержащими гидроксильные, хинонные, карбоксильные, альдегидо -, сульфо - и нитро-группы, органическими веществами, в состав которых входят атомы металлов, а также пористыми образованиями - активированным углём, каолином и т.д. (Адамов А.К, Бердиков В.Т., 1964). Иммуносорбенты могут быть получены из любых частиц, на которых фиксированные антитела сохраняют иммунологическую активность и специфичность. Суспензионные диагностикумы применяют в реакции суспензионной агглютинации (РСА), которую осуществляют на стекле или в U-образных иммунологических планшетах (Ramadass P., Samuel B., Nachimuthu K., 1999; Maruyama S., Boonmar S., Morita Y., 2000), обнаруживая невооруженным глазом склеивание или выпадение в осадок микробных тел при взаимодействии их со специфическими антителами, сорбированными на суспензии. Благодаря специфичности и простоте, реакция получила широкое распространение в микробиологической практике.

Среди матриц для суспензионных диагностикумов хорошо себя зарекомендовали латексы - полистирол, полиакролеин и др. (Лукин Ю.В. с соавт, 1985; Ерохин Е.П. 1991; Дячина М.Н. с соавт., 1995; Лазовская А.Л., Воробьёва З.Г., 2002). Латексы – водные эмульсии каучукоподобных полимеров, получаемые полимеризацией или сополимеризацией различных органических непредельных соединений (Бусеев А.И., Ефимов И.П., 1971). Реакции с использованием в качестве твёрдой основы латекса называются реакцией агглютинации латекса (РАЛ). Слининой С.А. (2001) выявлены микобактериальные антигены в моче больных с помощью РАЛ и показана перспективность использования данной реакции.

Особое распространение получили методы, основанные на применении антител, меченных специальными маркерами-флуорохромами, которые позволяют с помощью люминесцентного микроскопа проводить высокочувствительные определения исследуемого вещества в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) (Coons A.H. et al., 1942.). При диагностике туберкулёза ши-

роко используется люминесцентная микроскопия, основанная на том, что объекты (клетки), окрашенные специальными красителями (флуорохромами), дают излучение в видимом спектре света под действием облучения их ультрафиолетом. При обработке микобактерий флуоресцентными красителями (аурамин, родамин и др.) они связываются с воскоподобными структурами микробной клетки. По чувствительности люминесцентная микроскопия, особенно в сочетании с методом обогащения диагностического материала, незначительно уступает методу посева. Этим методом можно исследовать любой материал кроме мочи, в котором могут быть трудно дифференцируемые при такой окраске сапрофиты (Приказ МЗ СССР № 558, 1978).

Другим важным преимуществом метода люминесцентной микроскопии является способность обнаруживать изменённые микобактерии, утратившие под влиянием ряда факторов, в частности интенсивной химиотерапии, свойство кислотоустойчивости и не выявляющиеся в связи с этим при окраске по Цилю-Нильсену (Методические указания МЗ РФ «Микробиологические исследования при выявлении, диагностике и лечении туберкулёза», 2001).

При окраске микобактерий аурамином возможны ложноположительные результаты в процессе некачественного обесцвечивания мазка, что может привести к сохранению некоторыми сапрофитными бактериями оранжевого свечения. Микроскопические исследования с использованием окрасок по Цилю-Нильсену и аурамином не позволяют дифференцировать микобактерии комплекса *Mycobacterium tuberculosis* от нетуберкулёзных (атипичных микобактерий) - возбудителей микобактериозов. На основе этих методов можно только сделать заключение о наличии или отсутствии кислотоустойчивых микобактерий (приказ МЗ РФ № 109. Приложение №11, 2003).

В связи с этим, желательно использовать более специфические методы диагностики, основанные на образовании комплекса антиген-антитело, в частности - метод иммунофлуоресценции. Он достаточно прост, экономичен, может использоваться в экспресс - диагностике инфекционных заболеваний и

вместе с тем удобен для работы (Лопаткин О.Н., Кронгауз И.В., 1982; Greenlee M.T. et al., 1994; Gall D. et al., 2000; Nielsen K. et al., 2000).

Данный метод основан на использовании специфичности иммунологических реакций и чувствительности флуоресцентной микроскопии. Один из компонентов иммунной реакции (специфические иммуноглобулины) конъюгируется с флуоресцирующим красителем (меткой). После возбуждения флуоресцирующего агента ультрафиолетовым излучением визуализация антигена становится возможной непосредственно наблюдателю вследствие развития флуоресценции. В качестве флуорохрома применяют изоцианаты, изотиоцианаты и сульфохлорид флуоресцеинов, которые связываются с белковыми молекулами. Метка белка ФИТЦ проводится в щелочной среде. Интенсивность свечения уменьшается в 2-3 раза после присоединения ФИТЦ к белку, но остается достаточно высокой при просмотре в люминесцентном микроскопе. В реакции конъюгации в основном участвуют аминокислоты лизина и N-концевые аминокислоты белковой молекулы. Известно, что конъюгация белка с ФИТЦ является химической реакцией, зависящей от ряда факторов: чистоты и активности красителя, его количества при метке, концентрации белка, взятого в конъюгацию, количества и степени его очистки, состава буфера, величины pH, времени конъюгации и температуры реакции.

В настоящее время разработаны методы экспресс-диагностики туберкулёза, основанные на использовании РИФ с моноклональными видоспецифическими флуоресцирующими сыворотками (Воробьёв А.А., Кривошеин Ю.С., Широбоков В.П., 2003).

Большое внимание уделяется развитию методов флуоресцентного иммуноанализа с временным разрешением, что значительно повышает чувствительность анализа (Жердева В.В., Чудинов А.В., Савицкий А.П., 2002). В диссационно-усиленном лантаноидном флуоресцентном иммуноанализе используются ионы европия, тяжелого металла группы лантаноидов. Для образования прочной связи белка с ионом лантаноида применяют бифункцио-

нальные производные карбоновых кислот. На стадии детекции ионы европия диссоциируют из меченого антитела с поверхности твердой фазы в специальный раствор, образуя новый флуоресцирующий комплекс (Иванов Ю.В., Коровкин С.А., 1997).

Анализ данных литературы (Шаханина К.Л., Манько М.И., 1969; Шаханина К.Л., Походзей И.В., 1978; Стоев К.Г. с соавт., 1981; Пушкарь В.Г., Трофимов Е.Н., 1986; Ефременко В.И. с соавт., 1989; Moldey R.S., Jen S.P.S., Rembaum A., 1977) свидетельствует о перспективности разработки твердофазного иммуноанализа на основе РИФ с использованием иммуносорбентов, позволяющих выявлять не только корпускулярные, но и водорастворимые антигены.

Для избирательной сорбции некоторых бактерий и риккетсий с целью последующего выявления микроорганизмов в РИФ К.Л.Шаханина с соавт. (1969) применяли иммуносорбенты на основе целлюлозного носителя, при этом повышалась чувствительность метода в 10-15 раз, хотя он и не позволял проводить количественный учет свечения гранул.

Некоторые авторы работ считают, что синтетические диагностикумы на основе сефарозы, агарозы выгодно отличаются от эритроцитарных и латексных тем, что их качество не зависит от типа носителя, к которому присоединение антитела или антигена происходит ковалентно. Результаты исследований сыворотки больных хроническим бронхитом позволили сделать вывод, что приготовленные сефарозные антительные и антигенные диагностикумы достаточно специфичны и более чувствительны, чем РСК (Шаханина К.Л., Походзей И.В., 1978).

К.Г. Стоевым с соавт.(1981) разработан количественный метод РИФ с использованием специфического сефарозного иммуносорбента и люминесцентного микроскопа (DASS-система), что позволяет измерить концентрацию Ig E человека в пределах 5-2500 м.е./мл. Метод обладает рядом пре-

имущества, отличается малой затратой времени, доступен практически лабораториям.

В настоящее время появились сведения об усовершенствовании РИФ с использованием иммуносорбентов, обладающих магнитными свойствами. Описано использование магнитных полиакриламидных сорбентов (Пушкарь В.Г., Трофимов Е.Н., 1986; Ефременко В.И. с соавт., 1989; Подзолкова Г.Г. с соавт., 1989); магнитных органокремнезёмных сорбентов (Жарникова И.В., 1995; Афанасьев Е.Н., 2000, Базиков И.А., 2000); магнитных железоокисно-декстрановых частиц (Molday R.S. et al., 1977). К недостаткам последнего метода следует отнести необходимость применения мощных магнитных полей для сепарации этих частиц.

На основе твердофазных иммуносорбентов различной природы Г.Г. Подзолковой с соавт. (1989) предложен метод количественной иммунофлуоресценции, позволяющий выявлять с высокой чувствительностью различные антигены. Таким образом, РИФ с использованием иммуносорбентов может успешно применяться для выявления возбудителей инфекций. Однако совершенствование метода иммунофлуоресценции на твердой матрице во многом определяется качеством сорбентов, лиганда, техникой постановки реакции.

На основании того, что диагностика МТБ с помощью традиционных методов требует длительного времени и в условиях широкого применения разнообразных противотуберкулёзных препаратов изменилась биология возбудителя туберкулёза (морфология, ферментативная активность и биологические свойства) (Приказ МЗ РФ № 558., 1978), в микобактериологии на протяжении последних лет используются молекулярные технологии - методы генодиагностики, а именно полимеразная цепная реакция (ПЦР), что позволило разработать методы генотипирования и дифференцирования штаммов микобактерий туберкулёза на уровне хромосомной ДНК (Goto M., Oka S., Okuzumi K. et al., 1991; Lebrun L., Espinasse F., Povenda J. et al., 1992; Badak

F.Z., Goksel S., Sertoz B. et al., 1999). В основе ПЦР лежит амплификация участка генома путем многократного копирования специфической для данного микроорганизма нуклеотидной последовательности. Реакция осуществляется при помощи термостабильной ДНК-полимеразы и комплиментарных ДНК – мишени олигонуклеотидных праймеров. Образование в результате реакции фрагментов ДНК определённого размера оценивается как факт наличия в пробе клеток искомого микроба и позволяет идентифицировать исследуемую ДНК.

Визуализация результатов ПЦР достигается различными способами в зависимости от используемого формата реакции. При использовании электрофоретического разделения продуктов амплификации для обнаружения ампликонов используется окрашивание ДНК. Самый распространенный способ – окраска бромистым этидием с последующим просвечиванием геля на ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Этот метод высокочувствителен, но бромистый этидий является мутагеном и требует осторожного обращения. Еще один подход основан на использовании флуорохромов, которые излучают свет разных цветов. Deng Shaoli, Yang Yuan (2002) провели детекцию *Mycobacterium tuberculosis* в образцах слизи туберкулёзных и нетуберкулёзных больных с помощью культурального метода, рутинной ПЦР и новой техники ПЦР с использованием гибридизации с Tagman флуоресцентным зондом. Было установлено, что «Tagman – техника» является высоко чувствительной, специфичной и может использоваться для диагностики туберкулёза.

Известны различные варианты гибридизационно-ферментной детекции продуктов ПЦР. После амплификации ампликоны с включенными биотинилированными праймерами вносят в лунки микропланшета с иммобилизованными одноцепочечными зондами к этим фрагментам, проводят гибридизацию и после отмывки добавляют авидин с конъюгированной пероксидазой

или с фосфатазой, субстрат для фермента и выявляют окрашенный продукт с помощью фотометра.

Открытие генетических механизмов развития лекарственной устойчивости к противотуберкулёзным препаратам позволило разработать и внедрить в практику методы ПЦР, позволяющие определять вид мутаций, которые обуславливают снижение чувствительности к противотуберкулёзным препаратам (Рекомендации для национальных программ ВОЗ, 1978; Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., 1999; Черноусова Л.Н., Ларионова Е.Е., Денисова Т.С. с соавт., 2000; Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В., 2001; Тунгусова О.С., Марьяндышев А.О., 2003; Small P., van Embden J.D.A., 1994; WHO Geneva, 1998).

Использование ПЦР позволяет быстро (за 8-27 часов) выявить МТБ как при туберкулёзе органов дыхания, так и при внелёгочных формах (туберкулёзный менингит, туберкулёз кожи, кишечника и др.), в том числе у больных СПИДом. При высокой чувствительности метода (10-1000 клеток в пробе) имеется возможность выявлять штаммы *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. Методом ПЦР можно также контролировать эффективность лечения больных туберкулёзом. При использовании нескольких образцов исследуемого материала от каждого пациента специфичность ПЦР достигает – 99,8-100 % при высокой чувствительности (Воробьёв А.А., Кривошеин Ю.С., Широбоков В.П., 2003). Быстрота выполнения, возможность прямой детекции атипичных и некультивируемых форм микробов, высокая чувствительность метода указывают на перспективность ПЦР для детекции различных микроорганизмов (Куличенко А.Н. с соавт., 1996; Гинзбург А.Л., 1998; Вишневская Е.Б. с соавт., 2001; Самсонова С.А. с соавт. 2002; Ruiz-Bravo A., Jimenez- Valera M., , 1996; Burt F.J. et al, 1998; Eremenko E.I. et al., 1999; Tcherneva E. et al., 2000; Bricker B.J. et al., 2000). Генетические методы позволили повысить оперативность и информативность исследований (Бударина Н.А. с соавт., 2002; Drosten C., Gottig S., Schilling S. et al.

2002). W.Tan, N.Xia, Y. Cong (1998) для выявления низкой концентрации патогена разработали гнездовую ПЦР в одной пробирке, тем самым, исключая контаминацию исследуемой пробы.

И.В. Раковская с соавт. (2002) использовали оригинальную схему ПЦР-анализа, которая даёт возможность обнаружить персистирующие микоплазмы, не выявляемые рутинными методами, что весьма актуально для эффективной диагностики хронических форм инфекции.

Чувствительность ПЦР составляет величину порядка 100-1000 м.к./мл. (Куличенко А.Н., Попов Ю.А., Наумов А.В., 1995) и имеет преимущества над другими реакциями (Кулаков Ю. К. с соавт, 1992), но стоимость этого анализа пробы на порядок выше, чем при применении серологических методов, что существенно при проведении массовых анализов, в том числе мониторинговых. Недостатками ПЦР, кроме дорогостоящего оборудования и реагентов, являются ложноположительные результаты, выявляемые при обнаружении некоторых микобактерий из-за содержащихся в пробах веществ, ингибирующих реакции и обуславливающих ложные результаты (Ford E.G., Snead S.J., Todd J., 1993; Butler W.R., O'Connor S.P., Yakrus M.A. et al., 1994; Somoskovi A., Hotaling J.E., Fitzgerrald M., 2000). Хотя определение последовательности ДНК микроорганизмов – один из самых точных молекулярных методов, но он очень трудоёмок для клинических лабораторий.

Применение магноиммуносорбентов на предварительном этапе подготовки проб к проведению ПЦР позволило осуществить концентрирование антигена в пробах с низкой концентрацией микробов, очистить пробы от посторонней микрофлоры и других агентов, мешающих постановке ПЦР, использовать метод кипячения для выделения ДНК, исключив метод лизиса бактерий гуанидин-тиоцианатом с нуклеосорбцией, одновременно достигая стерилизации исследуемого материала, что упрощает анализ и сокращает время обнаружения возбудителя (Жилченко Е.Б., Ефременко В.И., 2002).

Изучение возможности создания оптимального алгоритма для диагностики туберкулёза по методу вегетативного резонансного теста (ВРТ) “ИМЕДИС-ТЕСТ” с использованием аппарата “МИНИ-ЭКСПЕРТ-ПК” и специально разработанных кассет для тестирования в экспериментальной работе, в клинической и практической медицине представлено в работе П.Ф. Шешукова, Ю.В. Готовского (2002). Метод основан на записи нозодов в потенциях D3-D200 лиофилизированных штаммов микобактерий туберкулёза и 12 основных антибактериальных препаратов, применяемых в фтизиатрии. Из 107 обследованных методом ВРТ у 90 были выявлены типичные и у 17 пациентов атипичные микобактерии, а также проведено определение поражённых органов, стадии процесса, устойчивости МБТ к антибактериальным препаратам. В работе П.Ф. Шешукова, Ю.В. Готовского (2002) представлена сравнительная характеристика различных методов диагностики туберкулёза по чувствительности, специфичности, времени детекции и установлено, что ВРТ превосходит остальные методы по всем показателям.

Для обнаружения возбудителей различных инфекционных заболеваний широко применяются методы с использованием антител (антигенов), меченых ферментами - иммуноферментный анализ (ИФА), принципы и особенности которого описаны во многих работах: (Нго Т. Т., Ленхофф Г. М., 1988; Яковлев А.Т., 1992; Подоляко М.П. с соавт., 1995; Engvall E., Perlmann P., 1971; Van Weemen B.K., Schuurs A.N., 1972; Guesdon J.L., Avrameas S., 1981; Sting R., Ortmann G., 2000 и т.д.).

Метод ИФА заключается в том, что на нерастворимую основу иммобилизуют антитела (антигены), вносят испытуемый материал, и образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляют с помощью конъюгата антител (антигена) с ферментом, активность которого регистрируют по изменению цвета субстрата фотометрически (Гаврилова Е.М., Дзантиев Б.В., Егоров А.М., 1980; Ficapal A. et al., 1995).

Ферментами - маркерами, используемыми в ИФА, могут быть щелочная фосфатаза, галактозидаза, глюкооксидаза, глюкоамилаза, пенициллиназа, но чаще применяют пероксидазу (Harding N., 1982).

Для приготовления иммуноферментных конъюгатов обычно используют перйодатный, глутаральдегидный методы (Умнова Н.С. с соавт., 1986; Nakane P.K., Kawaoi A., 1974; O'Sullivan M.J., Marks V., 1981), иногда применяют малеимидный метод (Kato K. et al., 1975; Weston P.D., Devries G.A., Wriggleworth R., 1980), но наиболее перспективным считается перйодатный метод конъюгации иммуноглобулина с ферментом (Anaokar S., Garry P.J., Standefer J.C., 1979).

Чувствительность и специфичность ИФА обусловлена не только степенью чистоты и активности используемых ингредиентов, но и свойствами твёрдой фазы, которая должна сохранять иммунохимические свойства и стабильность фиксированных веществ, обладать минимальной способностью неспецифически связывать компоненты анализируемой системы и быть удобной при разделении фаз (Щедрин В.И., Сбойчинов В.Б., Волков В.И., 1994; Дмитриев Г.А., Киселёва Т.А., 1997). В качестве твердой фазы используется поливинил, дакрил и другие синтетические полимеры, из которых изготавливают пробирки (Bushway R.J. et al., 1992) и микропланшеты из оптически прозрачного полистирола (Voller A. et al., 1976). Микропланшеты обладают не одинаковыми сорбционными свойствами, что существенно влияет на достоверность и воспроизводимость полученных результатов (Сухоруков А.М., Пономарёва А.М., 1987; Шаханина К.Л., Соколенко А.А., Павлова И.П., 1987). Количество антител (антигенов), используемое для образования иммунного комплекса, ограничено возможностями твёрдой фазы (Ометов В.К. с соавт., 1997). Недостаточная концентрация антител (антигенов) ограничивает чувствительность ИФА. Качество адсорбции фиксируемых на твёрдой фазе веществ зависит от температуры, рН, ионной силы, времени инкубации. Процесс сорбции обратим и, следовательно, сенсibilизированные

планшеты, полученные сорбционным путём, не подлежат длительному хранению (срок хранения 20 дней на холоде при герметизации) (Калинина О.А., Емельянова И.В., Локтионова М.А., 1997).

Е.В.Гучетль, Л.П.Пономарёва (2002) представили опыт определения противотуберкулёзных антител у больных урогинекологического отделения в иммуноферментном анализе и показали, что применение указанного теста в комплексе с клинико-лабораторным обследованием больных позволяет с высокой степенью достоверности диагностировать туберкулёз гениталий у женщин (88,5 %).

Известно применение магнитных частиц (Ефременко В.И., Климова И.М., Трофимов Е.Н., 1989; Тюменцева И.С., 1996), магнитных бус (Camargo Z., Guesdon J.L., Drouhet E., 1984.) в качестве твёрдой фазы при постановке различных иммунобиологических реакций.

В ряде работ (Климова И.М. с соавт., 1986; Ефременко В.И., Тюменцева И.С., 1995; Ефременко В.И. с соавт., 1996; Жарникова И.В., 2005) представлены данные об использовании магнитных сорбентов (МС) в тест-системе ИФА. Установлены оптимальные параметры анализа: зависимость адсорбирующей способности МС от его содержания в пробе, динамика адсорбции антигена при инкубации его с твёрдофазным носителем. Результаты исследований показали, что чувствительность метода в случае обнаружения бактериальных клеток составляла  $10^2$ - $10^4$  м.к./мл.

Известны работы О.В. Борисенко с соавт. (2001) по разработке и применению магнитоуправляемых диагностикумов в иммуноферментном анализе при выявлении возбудителя туберкулёза. Данные разработки актуальны, но имеют недостатки, связанные с использованием в качестве лигандов неадсорбированных сывороток, что приводит к неспецифической реакции.

Таким образом, ИФА является экспрессным, чувствительным, перспективным методом для диагностики возбудителей инфекционных заболеваний. Учитывая недостатки ИФА, необходимо вести поиск новых методов сохра-

нения активности сорбированных лигандов и инертных носителей, на поверхности которых протекают все процессы реакции ИФА.

Анализ достоинств и недостатков методов экспресс-диагностики позволил приступить к разработке эффективных диагностических препаратов, выявляющих возбудителя туберкулёза у больных и в объектах внешней среды, обладающих надёжностью, информативностью при высокой их специфической активности.

### **1.3. Носители иммобилизованных систем твёрдофазного иммуноанализа**

Развитие и использование твёрдофазных методов анализа предъявляет высокие требования к качеству иммуносорбентов. Согласно гипотезе В.Б.Алесковского (1976), любое твердое тело имеет остов и облегающие его атомы и группы атомов. С химической точки зрения, остов- ненасыщенное высокомолекулярное образование, представляющее собой макрорадикал, вокруг которого расположены функциональные группы высокомолекулярного соединения. Именно наличие этих групп определяет возможность использования поверхностных реакций для синтеза новых твердых веществ. Иммобилизация на твёрдых носителях различных биомолекул приводит к значительному повышению их термической устойчивости и стабильности (Абелян В.А., Африкян Э.Г., 1992; Масько А.А. с соавт., 1992).

В качестве сорбентов широко используются агарозные матрицы, активированные BrCN (Lowe C.R., Dean D.G., 1974.). Однако, наряду со всеми положительными сторонами данной матрицы, следует отметить недостаточную стабильность связи между лигандом и BrCN- активированной агарозой (Turkova J., 1978), низкую механическую стабильность сорбентов, что ограничивает возможности их практического использования.

В качестве природных твёрдофазных носителей используют целлюлозу, крахмал, агарозу (Аленкина Т.В., Данилина И.В., 2002) и т.д. Известны исследования по использованию в качестве матрицы сорбентов полисахарида

- хитина (Бендекене В.Г. с соавт., 1981); биосорбентов, состоящих из фракции молочных белков - казеина, который обладает термостабильностью, способностью связывать воду, коагулировать, желировать; микрокристаллической целлюлозы, являющейся неионогенным, гидрофильным полисахаридом (Кунижев С.М. с соавт., 2002); полиакриламидного геля, обладающего химической стабильностью и инертностью, прозрачностью, лабильностью структуры, устойчивостью к изменениям pH и температуры, нерастворимостью в большинстве растворителей (Гавенский С. Д. с соавт., 1990, 1991; Гавенский С.Д., Пушкарь В.Г., 1995; Подзолкова Г.Г. с соавт., 1988). Но данные препараты имеют недостатки, связанные с длительностью, многостадийностью их получения и использованием дорогостоящих импортных реактивов (Тюменцева И.С., 1996). В настоящее время широко применяются сорбенты на основе кремнезёма (Киселёв А.В., Кустова Т.Л., 1976; Хохлова Т.Д., Гаркавенко Л.Г., Никитин Ю.С., 1991; Брыкалов А.В., 1991; Темишевская Л.Я., 1995; Taylor D., 1972; Marshall K., Ridgewee N., Simpson J., 1974; Snyder L.R., Kirkland J.J., 1979). Это связано с тем, что их матрица по своей геометрической структуре и химическим свойствам хорошо подходит для адсорбции биополимеров.

В настоящее время созданы различные иммобилизованные структуры: биоаффинные адсорбенты (Гайда А.В., Староверов С.М., 1989; Лисичкин Г.В., 1989; Гонтарь И.П. с соавт., 1996); иммобилизованные ферменты (Брыкалов А.В. с соавт, 1982; Брыкалов А.В., 1993; Коваленко Г.А. с соавт., 2002); иммобилизованные лекарственные средства (Брыкалов А.В., Кобанкова А.Н., 2002; Герстунбергер М.Р. с соавт, 2002; Кунижев С.М., Аполохова С.Ф., 2002). В практической деятельности человека находят применение иммобилизованные клетки и антитела (Кузовлева А.А., Шаханина К.Л., 1982; Гавенский С. Д. с соавт., 1991; Ефременко В.И., 1997; Лавриненко И.А., Костровский В.Г., 1997; Кислицын Ю.В., Мешандин А.Г., 2001; Lea T. et al., 1985; Cunliffe D. et al., 2000). При постановке иммуноанализов (Kriz K., Gerhrke J.,

Kriz D., 1998; Yu H., 1998; Tanaka T., Matsunaga T., 2001; Richardson J. et al., 2001); культивировании микроорганизмов (Владимцева И.В., 2002; Hornung M., Ludwic M, Schmauder H.P., 2002) в ряде случаев также применяют различные иммобилизованные системы.

В качестве твёрдофазных носителей широкое распространение получили кремнезёмы. Реакционную способность их можно существенно повысить, обрабатывая поверхность различными неорганическими и металлоорганическими соединениями (Рогожина С.В., Варламов В.П., Вальковский Д.Г., 1975; Алесковский В.В., Юффа А.Я., 1989; Ходж Ф., 1989; Ходж Ф., 1989; Березин В.Б., Лахтин В.М., Ямсков И.А., 1995; Chim C., Wold F., 1974; Weetall H.H., Detor C.C., 1975), путём молекулярного наслаивания (Алесковский В.В., Юффа А.Я., 1989), либо подвергая механическому воздействию (растирание, дробление в среде модификатора) или облучению ( $\gamma$  и УФ). Метод химического модифицирования кремнезёмов с целью получения функциональных органокремнезёмов хорошо изучен и позволяет получать сорбенты с требуемыми свойствами. Им присущи гидрофильность, жесткость остова, химическая (Постнова А.М., Пак В.Н., Кольцов С.И., 1981) и микробиологическая устойчивость, каталитическая активность (Кольцов С.И., Алесковский В.Б., 1973), ненабухаемость в растворах, значительная адсорбционная емкость, отсутствие токсичности. Поверхность кремнеземных сорбентов содержит большое число силанольных (SiOH) и силоксановых групп (Si-O-Si) (Черкасов А.Н., Пасечник В.А., 1991).

Носители, обладающие магнитными свойствами и предназначенные для фиксации на них биополимеров, имеют значительные преимущества по сравнению с немагнитными. При их использовании не требуется предварительного концентрирования исследуемых проб с отделением выявляемых микроорганизмов от контаминирующей микрофлоры и других примесей, возможность проведения индикации на качественно более высоком уровне. В результате использования магносорбентов, способных осуществлять на себе

селективное концентрирование микроорганизмов, появляется возможность исследования проб с высокой степенью загрязненности, неограниченных объемов, с низкой концентрацией микроорганизмов при высокой чувствительности и специфичности метода исследования (Ефременко В.И., 1997; Weimer B.C. et al., 2001).

В качестве магнитных материалов в МС обычно используются окислы металлов Fe, Ni, Co (Пушкаръ В.Г. с соавт., 1984), порошки этих окислов заключаются в микросферы, плёнки полимеров, гранулы. А.М. Тишин, Ю.И. Спичкин (2004) предлагают использовать магнитный сорбент, состоящий из гидрофобного полимерного связывающего компонента, состоящего из мочевино-формальдегидной смеси с порофором и отвердителем, алюмосиликатного магнитного наполнителя и минерального масла. Г.Д. Елистратов, М.И. Волчанова, И.В. Малыгин с соавт. (2004) предлагают способ получения сорбента из измельчённого углеродсодержащего сырья, представляющего собой древесные частицы или отходы переработки однолетних растений.

Специалисты Литовского института химии и химической технологии установили возможность иммобилизации трипсина на магнитном хитине. Сравнительное изучение свойств нативного и магнитного производных хитина показало, что "намагничивание" матрицы способствовало уменьшению набухаемости, сохранению адсорбционных свойств и упрощению процесса выделения и регенерации иммобилизованных препаратов трипсина в результате применения внешнего магнитного поля (Бендикене В.Г. с соавт., 1995).

В связи с этим, МИС находят все большее применение в диагностике и обнаружении возбудителей различных заболеваний (Тюменцева И.С., Ефременко В.И., Афанасьев Е.Н. с соавт., 1995; Ефременко В.И., 1997; Жарникова И.В., 2004), а также при конструировании специфических сорбентов, используемых при лечении некоторых заболеваний (Гонтарь И.П. с соавт., 1998; Базиков И.А., 2000).

Расширение областей применения магнитных носителей, с одной стороны, способствует более детальному их изучению, с другой - предопределяет увеличение числа всевозможных методов их получения и конструирование на их основе новых диагностических препаратов для детекции возбудителей инфекционных заболеваний, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью.

Способность отдельных фосфолипидов формировать в водной среде при встряхивании «пузырьки жира», представляющие собой жидкокристаллическую мембрану, в полости которой и снаружи находится водная фаза, впервые была описана в 1965 году А.Бенхемом с соавторами. Эти «пузырьки», напоминающие под электронным микроскопом клетки, получили в дальнейшем название липосомы (бислойные липидные везикулы).

К настоящему времени разработаны несколько десятков методов получения липосом с включением в их внутренний объем или структуру мембраны различных по природе и физико-химическим параметрам веществ, обеспечивающих при необходимости высокий процент их иммобилизации, а также эффективные способы отделения липосом от несвязавшихся компонентов, методы их стерилизации и стабилизации, позволяющие сохранять целостность мембран липидных везикул относительно длительное время в различных реакционных средах и биологических системах. При этом, гидрофильные вещества фиксируются во внутренний объем липидных везикул, а гидрофобные – в их мембрану.

Возрастающий интерес к липосомам обусловлен совокупностью их физико-химических и биологических свойств. Их химическая инертность, универсальность, отсутствие токсичных, антигенных свойств, доступность сырья, простота включения лигандов и т.д. открывают возможности получения диагностических препаратов нового поколения с сохранением физико-химических и иммунологических свойств включаемых в липосомы веществ.

В качестве маркера, включаемого во внутренний объём бислойных липидных везикул, используют красители, флуорохромы, ферменты, радиоактивные вещества, углеводы и т.д., которые регистрируют соответствующим методом по мере появления их в анализируемой смеси после выхода из липосом (Власова Г.С., Салов В.Ф., Торчилин В.П. с соавт., 1982; Закревский В.И., Подзолков В.В., Мельников В.А., 1983; Закревский В.И., 1985; Остро М.Д., 1987; Сюнамото Дзюдзо, Акиёси Кадзунари, Сато Тосинори, 1989; Владимцева И.В., Плеханова Н.Г., Смирнова В.И. с соавт., 1990; Ревенко Л. Г., Ротов К.А., Васильев В.П. с соавт., 1990; Ротов К.А., Климова И.М., Васильев В.П. с соавт., 1992; Литчфилд У.Д., Фрейтаг Д.У., 1998; Ефременко В.И., 1999; McDougall I.R., Dunnick J.K., McNamee M.G. et al., 1974; Leserman L.D. et al., 1984; Sunamoto J. et al., 1987; Flechtner M.D. et al., 1990).

Иммобилизованный в липосомы материал оказывается защищённым липидной мембраной от действия неблагоприятных факторов внешней среды, благодаря чему увеличивается срок его годности (Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д., 1986; Марголис Л.Б., 1987; Liposomes, 1980; Liposomes, 1988).

При этом в липосомы возможно включение маркёров, которые в своей молекуле не содержат функциональные группы, необходимые для ковалентного присоединения к различным биополимерам, что зачастую является обязательным при использовании других диагностических методов исследования. Благодаря этому чрезвычайно расширяется круг используемых маркёров, включаемых в липосомальные диагностические препараты. Высокая же чувствительность липосомальных диагностических систем достигается тем, что в липидные везикулы удаётся фиксировать значительное количество маркёра.

Способность липосом с иммобилизованным на их поверхности одним из фрагментов реакции «антиген-антитело» специфически фиксировать недостающий компонент и в присутствии сывороточного комплемента, подобно некоторым клеткам микроорганизма, нарушать целостность своей мем-

браны с высвобождением заключённого во внутренний объём везикул маркёра используется при разработке высокочувствительных диагностических методов комплемент-зависимого иммунного лизиса липосом. Данная реакция позволяет обнаруживать в исследуемых объектах специфические гаптены, антигены, антитела или комплемент.

Реакция на основе иммуноанализа липосом (LILA-liposome immune lysis assay), получившая название липосомальный анализ (ЛИА), может осуществляться как в прямом, так и в конкурентном вариантах. По простоте регистрации и возможности автоматизации она не уступает традиционным методам, а по чувствительности и скорости ответа превосходит обычные радиоиммунный и иммуноферментный анализы (Ясуда Такудзи, 1986; Литчфилд У.Д., Фрейтаг Д.У., 1998; Сюнамото Дзюдзо, Акиёси Кадзунари, Сато Тосинори, 1989; Ефременко В.И., 1999; Vistnes A.I., 1984; Connor J. et al., 1985; Monroe D., 1986 а; 1986 б; Jou Yi-Her et al., 1990).

В ряде случаев маркёры иммобилизируют на поверхности мембраны липосом. Иммобилизация ингредиентов иммунологической реакции (антигенов и антител) с липидной мембраной липосом представляет определённую трудность в связи с её гидрофобной природой. Описаны различные методы ковалентного связывания белковых молекул с наружной поверхностью липосомальной мембраны: посредством глутарового альдегида, периодата натрия, галактозидазы (Chua M.M. et al., 1987; Yu B.S. et al., 1987). Образующиеся альдегидные группы связывали с поверхностью липосом посредством предварительно введённых гидразидных групп. Такой способ позволяет связывать до 60 % добавленного в реакцию модифицированного белка (Владимцева И.В., 2002).

Иммобилизация рецепторных молекул гидрофобной природы, например, ганглиозидов, не представляется методически трудной, поскольку включение осуществляется путём совместного озвучивания в процессе приготовления липосом (Moss J., Fishman P.H., Richards R.L. et al., 1976 Masserini M., Sonnino

S., Giuliani A., Tettamanti G. et al., 1984; Umeda M., Kanda S., Nojima S. et al., 1984).

В качестве твёрдой фазы при проведении липосомального иммуноанализа используют наносимые на твёрдую поверхность мазки из зева, содержащие  $\beta$ -гемолитический стрептококк группы А (Gerber M.A. et al., 1990), а также пластиковые пробирки, полимерные микроплаты, диски нитроцеллюлозной бумаги, стеклянные бусы, покрытые различными специфическими иммуноглобулинами.

Дополнительные преимущества данный метод приобретает при использовании твёрдофазных магнитных сорбентов, позволяющих легко сепарировать компоненты реакционной системы в магнитном поле и эффективно регистрировать анализируемые вещества. С помощью данного метода выявляют различные микроорганизмы и их антигены. В этом случае на магнитные сорбенты вначале фиксируют исследуемый материал за счёт специфической реакции «антиген-антитело», а затем липосомы. Освобождение маркера, включённого в бислойные липидные везикулы, с последующей его количественной регистрацией осуществляют в присутствии органических растворителей, поверхностно-активных и других веществ, воздействием повышенной температуры, приводящих к лизису липидных мембран, после того, как не связавшиеся с твёрдой фазой компоненты реакции удаляются, а липосомы за счёт специфических реакций остаются фиксированными на твёрдой поверхности (Ефременко В.И., 1999).

К.А. Ротовым с соавт. (1992) продемонстрирован метод обнаружения чумного микроба с использованием магнитных полиакриламидных гранул и радиоактивной метки, включённой в липосомы, на поверхности которых фиксировали иммуноглобулины. Метод позволил выявлять возбудитель чумы в концентрации  $10^3$  м.к./мл и 10 пг/мл фракции I чумного микроба.

И.В. Владимцевой (2002) разработаны биотехнологические аспекты конструирования диагностических тест-систем на основе МИС и люминес-

цирующих липосом, позволяющих выявлять  $0,6 \pm 0,014$  мкг чумных иммуноглобулинов и 15 нг/мл холерного энтеротоксина.

Из проведённого анализа литературных данных следует, что в настоящее время используется небольшое количество экспресс-методов, позволяющих выявлять микобактерии туберкулёза. Для достоверной диагностики туберкулёза рекомендовано проводить комплексное обследование больных с использованием нескольких методов, так как ни один из существующих анализов не может подтвердить диагноз во всех случаях болезни. Многие реакции громоздкие и сложные, а методы их постановки малорезультативны. В связи с этим продолжается поиск универсальных методов выявления туберкулезных антигенов и антител, замена существующих рутинных тестов на современные, высокоэффективные способы.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Штаммы микроорганизмов, взятые в работу

В работе использованы штаммы микроорганизмов, характеристики которых представлены в таблице 1.

### 2.2. Питательные среды, условия культивирования микроорганизмов

Выращивание туберкулёзных и близкородственных микобактерий *M. tuberculosis humanus*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. intracellulare* проводили при температуре 37 °С в течение 30 дней на яичной среде Лёвенштайна-Йенсена. Выращивание гетерологичных культур *Nocardia brasiliensis* проводили при температуре 37 °С в течение 3 дней на мясопептонном агаре; *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* и *Brucella suis* - при температуре 37 °С в течение 3 дней на печёночном агаре, *Salmonella typhi* - при температуре 37 °С в течение 2 дней на среде Эндо; *Streptococcus*, *Staphylococcus* - на кровяном агаре при температуре 37 °С в течение 2 дней; *Listeria monocytogenes* - при температуре 37 °С в течение 3 дней на глюко-глицериновой среде.

Штаммы микобактерий туберкулёза, полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича, заседали на среду Лёвенштайна-Йенсена и выращивали при температуре 37 °С в течение 1 месяца, контролируя посевы каждые 10 дней (визуальный контроль и микроскопия с окраской по методу Циля-Нильсена и флуорохромом - аурамином). Из биохимических тестов применяли ниациновую пробу Конно (по методике, описанной в работе Воробьёва А.А., Кривошеина Ю.С., Широбокова В.П., (2003), основанную на способности МТБ в отличие от других микобактерий индуцировать ниацин). Для посева в широкие пробирки использовали культуру, смытую 0,9 % раствором хлорида натрия, которую инкубировали в течение 1 месяца при температуре 37 °С, смывали 0,9 % раствором натрия хлорида и обеззараживали холодным (минус 20 °С) ацетоном.

У МТБ отсутствует наружная мембрана, как у Грам «+» бактерий.

**Таблица 1. Характеристика штаммов микроорганизмов, использованных в работе**

№№ пп	Наименование микроорганизмов и обозначение штамма	Характеристика штаммов		
		морфологические и тинкториальные свойства	культуральные свойства	Биохимические свойства
1	2	3	4	5
1.	<i>M. tuberculosis humanus</i> <i>H 37 RA</i>	Полиморфные тонкие спирто- и кислото-устойчивые палочки, изогнутые, лежащие под углом друг к другу и образующие скопления. Неподвижны, спор не образуют, лишены капсулы.	На плотной яичной среде, содержащий глицерин, при температуре 37-38 °С дают пышный рост колоний через 10-20 сут в виде шероховатых R-колоний, но могут быть гладкие, сливающиеся между собой (S вариант), имеют кремовый оттенок. На жидкой питательной среде растут в виде морщинистой грубой плёнки, а иногда наблюдается придонный крошковатый рост.	Восстанавливают нитраты. Способны к образованию кислой фосфатазы, β-эстеразы, уреазы, пиразимидазы. Аккумулируют ниацин.
2.	<i>BCG</i>	Полиморфные тонкие спирто- и кислото-устойчивые палочки, изогнутые, лежащие под углом друг к другу и образующие скопления. Неподвижны, спор не образуют, лишены капсулы.	На плотной яичной среде, содержащий глицерин, при температуре 37-38 °С дают менее пышный рост колоний, чем <i>M. tuberculosis humanus</i> . Через 10-20 сут вырастают в виде мелких гладких, влажных колоний, имеющих белый или сероватый цвет. На жидкой питательной среде образуют более тонкую плёнку, чем <i>M. tuberculosis humanus</i> .	Не восстанавливают нитраты. Способны к образованию кислой фосфатазы, β-эстеразы, уреазы. Пиразимидазу и ниацин не аккумулируют.

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
3	<i>M. avium D4 ER</i>	Тонкие кислотоупорные палочки, более длинные и полиморфные в мазках-отпечатках из органов заражённых кур, мышей или кроликов. Неподвижны, спор не образуют, лишены капсулы.	Колонии в виде приподнимающихся над поверхностью среды "лепёшечек", или в виде "бубликов". Рост появляется к концу 1-го месяца, иногда позднее; при пересевах - к концу 7-10 дня. В субкультурах растут гладким, влажным налётом. В жидкой среде дают помутнение. Культуры лучше растут при 43-45 <sup>0</sup> С. Пассированные культуры могут давать также хороший рост при 37 <sup>0</sup> С, иногда- при 22 <sup>0</sup> С. Колонии кремоватого цвета, но возможно и более интенсивное окрашивание их в жёлтый цвет.	Не восстанавливают нитраты. Способны к образованию β-эстеразы, пиразимидазы. Не образуют кислую фосфотазу, уреазу. Ниацин не аккумулируют.
4.	<i>M. kansasii Yoss</i>	Фотохромогенные микобактерии умеренной длины. Неподвижны, спор не образуют, лишены капсулы.	На яичной среде растут в виде шероховатых или гладких колоний, температурный оптимум роста 37 <sup>0</sup> С.	Восстанавливают нитраты. Способны к образованию кислой фосфотазы, уреазы, пиразимидазы. Не образуют β-эстеразы. Не аккумулируют ниацин.
5.	<i>M. intracellulare #23</i>	Нефотохроматогенные палочки средней длины. Неподвижны, спор не образуют, лишены капсулы.	Дают рост на среде Левенштейна-Йенсена в виде непигментированных колоний при 37 <sup>0</sup> С и 45 <sup>0</sup> С.	Не восстанавливают нитраты. Способны к образованию β-эстеразы, пиразимидазы. Не образуют кислую фосфотазу, уреазу. Ниацин не аккумулируют.

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
6.	<i>Nocardia brasiliensis</i>	Клетки кислотоустойчивые, прямые или изогнутые с частым ветвлением. Диаметр нитей – 0,3-1,3 мкм. Грамположительные в патологическом материале, Грам-отрицательные в старых культурах.	Хорошо растут на мясопептонном агаре, мясопептонном бульоне с глюкозой, агаре Сабуро при температуре 37 <sup>0</sup> С. На твёрдых средах на 2-3 сут образуют мелкие гладкие влажные колонии тестоватой консистенции, через 72 ч их поверхность становится исчерченной и петливой. На жидких средах первоначально появляется тонкая прозрачная плёнка, постепенно плёнка становится кремово-жёлтого цвета и достигает краёв пробирки.	Ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу. Не образуют индола. Белки ферментируют с образованием сероводорода. Разлагают казеин, тестостерон, эскулин. Способны к образованию кислой фосфатазы, β-эстеразы и уреазы.
7-9	<i>Brucella melitensis</i> 565, 16-M, Rev-1 (вакцинный)	Мелкие коккобактерии, величиной 0,3-0,5 мкм. Неподвижны, не образуют спор. Красятся всеми анилиновыми красками, грам-отрицательные.	Строгие аэробы. Наилучшая питательная среда – печёночный бульон или агар. Для бруцелл характерен медленный рост первых генераций от 20 до 30-35 дней. Лабораторные культуры вырастают через 2 сут. На агаре при pH среды 6,6-7,4 и температуре 37 °С образуют круглые, выпуклые, гладкие, блестящие, однородные или нежнозернистые колонии. На бульоне формируют помутнение. Не лизируются бактериофагом «ТБ».	Не разжижают желатину, не расщепляют белков, не образуют сероводород. Тионин и основной фуксин 1:25 000 не оказывают бактериостатического действия. Окисляют аланин, аспарагин, глутаминовую кислоту, глюкозу, эритрит.
10-12	<i>Brucella abortus</i> 544, 345, 19-BA (вакцинный)	Мелкие коккобактерии, величиной 0,3-0,5 мкм. Неподвижны, не образуют спор. Красятся всеми анилиновыми красками, грам-отрицательные.	Первые генерации требуют повышенного содержания в атмосфере СО <sub>2</sub> . При последующих пересевах СО <sub>2</sub> –зависимость теряется. В остальном культуральные свойства аналогичны <i>B.melitensis</i> . Лизируются бактериофагом “ТБ”.	Не разжижают желатину, не образуют индола, не свертывают молоко, не расщепляют углеводов, ферментируют белки с образованием аммиака и сероводорода. Основной фуксин 1:25 000 не задерживает роста; тионин 1:25 000 действует

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
				бактериостатически. Окисляют аланин, аспарагин, глутаминовую кислоту, арабинозу, галактозу, рибозу, глюкозу, эритрит.
13-15	<i>Brucella suis</i> 1330, 508, 6	Мелкие коккобактерии, величиной 0,3-0,5 мкм. Неподвижны, не образуют спор. Красятся всеми анилиновыми красками, грамотрицательные.	Строгие аэробы. На агаре и бульоне на 2-3 сут дают типичный для бруцелл рост. Не лизируются бактериофагом «ТБ».	Биохимическая активность незначительна. Не образуют индола, не разжижают желатину, не свёртывают молоко. Тионин 1:25 000 не оказывает влияния на рост м.к., основной фуксин 1:25 000 действует бактериостатически. Окисляют глутаминовую кислоту, рибозу, глюкозу, эритрит, ксилозу, аргинин.
16-17	<i>Salmonella typhi</i> 818, 4446	Небольшие грамотрицательные палочки. Подвижны, имеют перитрихальные жгутики. Кислотолабильные. Спор и капсул не образуют.	Факультативные анаэробы. Хорошо растут на средах с мясным экстрактом при температуре 37 °С (рН 7,2). На средах Плоскирева, Левина и Эндо – колонии прозрачные, бесцветные или голубоватые; на висмут-сульфитной среде – колонии чёрные или чёрные со светлым ободком, блестящие.	Желатин не разжижают, индол не образуют, продуцируют сероводород. Молоко не свёртывают. Ферментируют с образованием кислоты глюкозу, маннит, мальтозу, левулезу, галактозу, раффинозу, декстрин, глицерин, сорбит. Восстанавливают нитраты в нитриты.
18	<i>Streptococcus faecalis</i>	Грамположительные кокки. Расположены цепочками, спор не образуют.	Растут на сывороточных средах и на кровяном агаре. Образуют округлые, мелкие, блестящие с ровным краем колонии, окружённые зоной гемолиза. При росте на жидких питательных средах культуральная среда остаётся прозрачной, на дне формируется осадок.	Разлагают с образованием кислоты лактозу, маннит, глицерин, салицин.

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
19-20	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ACCT 25923	Грамположительные кокки. При размножении образуют скопления в виде гроздьев винограда.	Факультативные анаэробы, лучше развиваются в аэробных условиях. На поверхности плотных питательных сред образуют круглые, выпуклые, пигментированные колонии с ровными краями; в жидкой среде формируется равномерное помутнение.	Ферментируют углеводы с образованием кислоты. Расщепляют маннит, образуют H <sub>2</sub> S, не образуют индол, медленно разжижают желатину.
21-27	<i>Listeria monocytogenes</i> 1 – 7 серотип	Небольшие грамположительные кокковидные палочки. Образуют цепочки из 3-5 и более клеток. В мазках из 18-24-часовых колоний обнаруживается типичная дифтероидно-палисадное расположение с небольшим количеством V и Y-образных форм. Подвижные, с перитрихияльными жгутиками, если выращены при температуре 20-25 °С. При выращивании при температуре 37 °С имеют один полярный жгутик. Не кислотоустойчивы. Не образуют спор и капсул.	Аэробы. Растут при температурах от 4 до 38 °С, оптимальные показатели pH среды 7,0-7,4. На агаре – мелкие, 1-1,5 мм колонии в виде колечек. Колонии круглые, имеют перламутровый оттенок, полупрозрачные. Имеются также колонии переходные, шероховатые, с неровными краями и бугристой поверхностью. На печёночных, глюкозных, глицериновых средах формируют пышный рост. При росте на мясо-пептонном бульоне образуют равномерную муть, переливающуюся при легком встряхивании в виде муаровых волн. На 5-7 день появляется на дне слизистый осадок.	Желатину, казеин и молоко не гидролизуют. Не ферментируют маннит, дульцит, арабинозу. Сбраживают с образованием кислоты без газа глюкозу салицин, маннозу. Редуцируют метиленовую синьку. Не образуют индол, сероводород, аммиак. Не восстанавливают нитриты

Основными структурными компонентами клеточной стенки туберкулёзных микобактерий являются пептидогликан, полимер N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамовая кислота. ЛПС представлены арабиногалактаном. Миколовая кислота играет важную роль в кислотоустойчивости бактерий, определяя первую линию защиты от неблагоприятных условий (Heifets L.B, Jenkins P.A. 1998).

### **2.3. Объекты исследования**

Для работы использовался материал (моча и мокрота) от больных туберкулёзом лёгких, почек, мужских половых органов, глаз, предоставленный сотрудниками Краевого клинического противотуберкулёзного диспансера (ККПТД).

### **2.4. Получение антигенных комплексов микроорганизмов**

Водорастворимые антигены изолировали комплексным методом: водно-солевой экстракцией и дезинтеграцией микроорганизмов (Афанасьев Е.Н., Таран И.Ф., Тюменцева И.С., 1986; Василенко Н.Ф. с соавт., 1988). Экстракцию проводили 2,5 % раствором NaCl. Дезинтегрирование осуществляли разрушением под высоким давлением в X-прессе (Швеция) и ультразвуковым методом на аппарате УЗДН - 2Т (Россия) при частоте колебаний 22 и 44 кГц в течение 20 мин при температуре 0-4 °С. О степени разрушения микробных клеток судили по изменению оптической плотности, которую регистрировали фотоэлектроколориметрически (ФЭК-4, зеленый светофильтр) по количеству белка в надосадочных жидкостях, полученных центрифугированием при 20000 g в течение 30 мин, и микроскопически.

### **2.5. Лабораторные животные, использованные в экспериментах**

В опытах были использованы:

1. 34 кролика обоего пола породы «Шиншилла», массой 3-3,5 кг;
2. 30 беспородных белых мышей, массой 18-20 г;
3. 15 морских свинок, массой 250-300 г;

Кроликов, мышей получали из питомника Ставропольского научно-исследовательского противочумного института и после карантинизации использовали в опытах. В процессе содержания животных поддерживали рекомендуемый режим питания согласно приказу МЗ РФ № 1179 (М., 1983).

Все процедуры на экспериментальных животных проводили согласно рекомендациям В.В. Карпенко, В.И. Сачков (1985).

## **2.6. Методы иммунизации животных**

Иммунизацию проводили по схеме, разработанной И.С.Тюменцевой (1994) и Е.Н.Афанасьева (2000). В качестве иммуномодуляторов использовали феракрил, тималин, циклофосфан.

## **2.7. Методы контроля антигенов и сывороток**

Постановку реакции радиальной иммунодиффузии проводили по О.Оухтерлони (1949) на предметных стёклах или в чашках Петри в 1% агаровом геле.

Анализ антигенного состава туберкулёзного микроба проводили согласно методикам, описанным в книге Г.Фримеля (1987).

Контроль титра специфических антител в сыворотках определяли в НРИФ по Т.Н.Weller, А.Н.Coons (1954). Микроскопию препаратов осуществляли в падающем отраженном свете в люминесцентном микроскопе серии "Люам", используя соответствующие фильтры согласно инструкции по эксплуатации прибора. За положительный результат принимали яркую (4+,3+) флуоресценцию периферии микробных клеток.

## **2.8. Выделение иммуноглобулинов**

Для осаждения иммуноглобулинов применяли сульфатный метод (Русанов В.М., Скобелев Л.И., 1980), метод фракционирования белковых смесей с использованием высоко-молекулярного, незаряженного, линейного полимера - полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) по A.Polson и др. (1964), а также каприловой кислоты (Steibuch G., Andran R., 1969).

## **2.9. Получение и контроль иммунофлуоресцирующих конъюгатов**

Конъюгацию иммуноглобулинов, фракционированных каприловой кислотой (Steibuch G., Andran R., 1969), с ФИТЦ ( $C_{21}H_{11}NO_5S$ ) фирмы «Sigma» проводили по Х.Шторц (Stortz, 1987). Прямой метод окраски препаратов осуществляли по А.Н.Сoons, М.Н. Kaplan (1950).

## **2.10. Получение и контроль липосом**

Фосфолипиды, из которых конструировали липосомы, выделяли из мозга к.р.с. и свиней путём экстракции смесью хлороформ-этанол в соотношении 2:1. После фильтрации раствора фосфолипиды осаждали добавлением 1,5-2,0 объёмов ацетона. Состав липидов определяли по методике, описанной в книге М. Кейтс (1975) с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол». Формирование липосом и определение их размеров контролировали на электронном микроскопе Hol (Япония) JEM – 100SX.

## **2.11. Получение и контроль иммуноферментных конъюгатов**

Иммунопероксидазные конъюгаты получали методом перйодатного окисления по Р.К.Nakane, А.Кawaoi (1974) в модификации Е.А.Ткаченко с соавт. (1982).

Рабочий титр и специфическую активность конъюгатов определяли по методике М.Clark и А. Adams (1977) в “сэндвич”-варианте ИФА.

## **2.12. Физико-химические методы**

Количественное определение белка проводили по методу О.Warburg и W.Christian (1941) сравнением спектра поглощения белков при длине волн 280 и 260 нм на спектрофотометре СФ-46 (Практическая химия белка, 1989).

Спектр поглощения микробных антигенов определяли на спектрофотометре «Specord» (ГДР) при длине волн  $\lambda$  210-300 нм.

Очистку конъюгатов от непрореагировавшего флуорохрома осуществляли методом восходящей хроматографии на бумаге (Носков Ф.С., 1985).

Определение растворимости, цветности, прозрачности проводили визуально в соответствии с методикой, описанной в ГФ СССР, XI изд., т.1, стр.194,195 и МУК 4.4/1.2.588-96, с.118.

Контроль потери в массе при высушивании проводили в соответствии с методикой, описанной в МУК 4.1/4.2.588-96, с.116.

Микроструктуру поверхности магносорбентов (МС) определяли по методу, описанному в работе Д.Фрайфелдера (1980). Удельная поверхность МС определялась по методу А.А.Клячко-Гурвича (1961), основанному на низкотемпературной адсорбции азота. Суммарный объем и радиус пор МС определен по методу Н.В.Кельцева (1984).

### **2.13. Иммунохимические методы анализа**

Анализ антигенного состава микроорганизмов и качества полученных иммунных сывороток проводили в реакции иммунодиффузии в 1 % агаровом геле (Difco, USA) по О. Ouchterlony (1949).

Очистку иммунопероксидазных конъюгатов от несвязавшихся иммуноглобулинов и фермента проводили на хроматографической колонке фирмы LKB, используя сефадекс G-100.

Для иммуноэлектрофореза использовали 1 % агар Дифко на веронал-медианоловом буфере, pH 8,6, ионная сила 0,05. Для проведения электрофореза использовали комплектную систему для горизонтального электрофореза «Мультифор» LKB. Электрофорез проводили в течение 100-120 мин и напряженности электрического поля 6 Вт/см<sup>2</sup>.

### **2.14. Лиофилизация биологического материала**

Лиофилизацию препаратов проводили в камере LZ-9с (Чехословакия). Готовые препараты разливали в ампулы, замораживали в низкотемпературном столе LZ-28O/75 при температуре минус  $(45 \pm 5) ^\circ\text{C}$  не менее 18 ч и высушивали в сушильной камере под вакуумом.

## 2.15. Характеристика реагентов, используемых для получения магнитоносорбентов

В качестве основной матрицы при конструировании МС использовали алюмосиликат (ТУ 6-09-01-356-76), представляющий собой тонкодисперсный продукт, содержащий в своем составе двуокись кремния, алюминия (насыпная плотность – 320 кг/м<sup>3</sup>; влажность при температуре 110 °С (массовая доля) – 3,5 %; содержание SiO<sub>2</sub> - 85-90 %; содержание Cl в пересчёте на NaCl- 0,2 %, содержание SO<sub>3</sub> – 0,6 %).

Модификаторами сорбентов являлись декстран (полиглюкин)-полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, соединенных 1,6-гликозид-гликозными связями. Молекулярная масса декстрана 0,5x10<sup>9</sup>. В работе использован препарат декстрана, выпускаемый комбинатом медпрепаратов "Красноярск"; магнитный порошок-III окись железа ГОСТ 4173-77 ч.д.а. с содержанием основного вещества 98,7 %; натрий перхлорат- ТУ 6-09-3582-74 с содержанием основного вещества 98,0 %, вторичный алкилсульфат натрия - ТУ 38-10719-77.

## 2.16. Методы математической и статистической обработки материалов

Для подтверждения воспроизводимости и достоверности результатов, полученных при исследовании, применяли статистические методы (Тамбовцев Е.П., Ахметкалиев С.Г., Пятницкий Н.П., 1969; Скуч Д., Уэст Д., 1979).

Математическую обработку результатов экспериментов проводили на компьютере (программа EXCEL). Расчет значения средней квадратичной ошибки отдельного измерения (S), выборочной дисперсии (S<sup>2</sup>), вероятного квадратичного среднеарифметического отклонения (E<sub>0,95</sub>), проводили по формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (C_i - C)^2}{n - 1}}; \quad S^2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (C_i - C)^2}{n - 1}; \quad E = \frac{t \times S}{\sqrt{n}}, \quad \text{где}$$

C<sub>i</sub> – измерение опыта; (C<sub>i</sub> - C) – разность между измерениями;

t - 4,3 при двух степенях свободы с доверительной вероятностью 0,95.

### **ГЛАВА 3. Получение высокоактивного специфического биологического сырья (антигенов и антител) для конструирования диагностических препаратов**

#### **3.1. Получение антигенных комплексов микобактерий туберкулёза**

Для получения качественных иммунных сывороток, применяемых при производстве туберкулёзных диагностических препаратов, необходимы активные антигенные комплексы, используемые при иммунизации. Характерным для МТБ является наличие большого количества липидов в цитоплазме. Липиды микобактерий подразделяются на свободные и гликолипиды. Прочно связанные липиды обуславливают кислотоустойчивость микобактерий, при удалении их из клетки микобактерии теряют возможность вызывать гиперчувствительность замедленного типа и резистентность к туберкулёзу (Гизатулина Н.М., 1996). Миколовые кислоты микобактерий характеризуются содержанием значительно большего числа атомов углерода в цепи ( $C_{60-90}$ ), чем у нокардий ( $C_{32-60}$ ), и при пиролизе освобождают жирные кислоты с числом атомов  $C_{22-26}$ . Установлено, что вирулентные виды микобактерий содержат значительное количество фтиеновых кислот и воска фтиоцеролдимикодерозата, что не характерно для нокардоподобных бактерий. Только у микобактерий обнаружен необычный тип липополисахарида, состоящий из Д-глюкозы, 6-0- метилглюкозы и 3-0-метилглюкозы. На содержание и структуру тех или иных химических компонентов в клетках могут оказывать влияние состав питательной среды, на которой выращивается микроорганизм, и температура его культивирования. Известны данные о том, что содержание фосфолипидов зависит от возраста и условий культивирования МТБ, от методов, используемых для их обнаружения (Андреев Л.В., 1997).

Нами проведены исследования по подбору эффективных способов извлечения специфических антигенов из бактериальных масс МТБ, обладающих необходимыми физико-химическими и иммунологическими свойствами. Для этого использовали штаммы, представленные в таблице 1.

Водорастворимые туберкулёзные антигены изолировали комплексным методом: последовательно водно-солевой экстракцией, механической и ультразвуковой дезинтеграцией. О степени разрушения микробных клеток судили по изменению оптической плотности, которую регистрировали фотоэлектроколориметрически и по количеству белка в надосадочных жидкостях, полученных центрифугированием при 20000 g в течение 30 мин, а также микроскопически с помощью биологического микроскопа.

Кроме водно-солевой экстракции нами использован дополнительно метод дезинтеграции в связи с тем, что в основе широко используемых физических методов дезинтеграции лежит механизм высокоградиентных течений жидкости. Под воздействием ультразвуковых волн наступает разрушение клеток микробов, а изменения в структуре химических веществ, находящихся в них, происходят гораздо медленнее, что обеспечивает возможность получения различных активных комплексов, близких к нативным.

### **Технология получения водорастворимых антигенов:**

I стадия. Экстрагирование раствором хлорида натрия и фракционирование сернокислым аммонием.

Бакмассы микобактерий, обеззараженные и высушенные ацетоном, экстрагировали в 5-10 объёмах 2,5 % раствора хлорида натрия. После центрифугирования при 20 000 g в течение 30 мин супернатант отделяли от осадка. Для фракционирования антигенов в супернатант добавляли сульфат аммония до 80 % насыщения и перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин. Полученный раствор оставляли на 16-18 часов при 4 °C для формирования осадка, после чего смесь центрифугировали при 20 000 g в течение 30 мин, супернатант удаляли, а осадок растворяли в 0,9 % растворе хлорида натрия pH 7,2 в соотношении 1:1 и проводили диализ против водопроводной, а затем дистиллированной воды до отсутствия ионов  $\text{NH}_2^+$ , определяемых реактивом Несслера.

II стадия. Механическая дезинтеграция

Осадок, полученный после центрифугирования бактериальной массы и взвешенный в 0,9 % растворе хлорида натрия pH 7,2 в соотношении 1:1, в объеме 30 мл помещали в камеру X-пресс дезинтегратора, предварительно охлажденного в течение 2 часов при температуре минус 40 °С. Микробные клетки в дезинтеграторе замораживали при той же температуре в течение 8 часов. После этого проводили разрушение клеток на гидравлическом прессе, четырехкратно продавливая бакмассу через калиброванное отверстие патрона дезинтегратора. Далее биомассу размораживали и центрифугировали при 20 000 g в течение 30 минут.

### III стадия. Ультразвуковая дезинтеграция

Осадок, полученный после предыдущей стадии, суспендировали в 0,9 % растворе хлорида натрия pH 7,2 в соотношении 1:1, добавляли детергент твин-80 до конечной концентрации 0,1 % для улучшения солюбилизации белковых компонентов структур рибосом и мембран клеточных элементов. Твин-80 снижает поверхностное натяжение бактериальной стенки, ограничивает её способность противостоять внутриклеточному давлению, что облегчает разрыв стенки с выходом клеточного содержимого в раствор. Полученную суспензию микробных клеток в объеме 30 мл помещали в дезинтегратор УЗДН-2Т. Используя ультразвуковые колебания различной частоты (22 и 44 кГц), интенсивности и варьируя длительностью воздействия на микобактерии (от 5 до 30 мин) при температуре 0-4 °С, мы получили разный эффект: от слабо выраженных изменений до полного разрушения микробных клеток. Следует учитывать, что при жестких режимах ультразвукового воздействия в ультразвуоченной водной среде вследствие возникновения в кавитационных областях электрического напряжения образуются продукты расщепления ионизированных молекул воды- свободные гидроксильные радикалы и атомарный кислород. Эти продукты инициируют деградацию некоторых биологически активных веществ. В результате было установлено, что

наиболее эффективными параметрами являются: время воздействия 20 мин при частоте 22 кГц.

На заключительном этапе приготовления антигенного комплекса все полученные антигенные фракции микобактерий туберкулёза смешивали (рисунок 1).

Выход отдельных антигенов туберкулёзного микроба из 100 мг бак-массы и их специфическая активность представлены в таблице 2. Качество полученных антигенов контролировали измерением концентрации белка на спектрофотометре СФ-26 при длинах волн 260 и 280 нм, в реакции преципитации в геле по О.Оухтерлони с туберкулёзной сывороткой, полученной нами (СтавНИПЧИ).

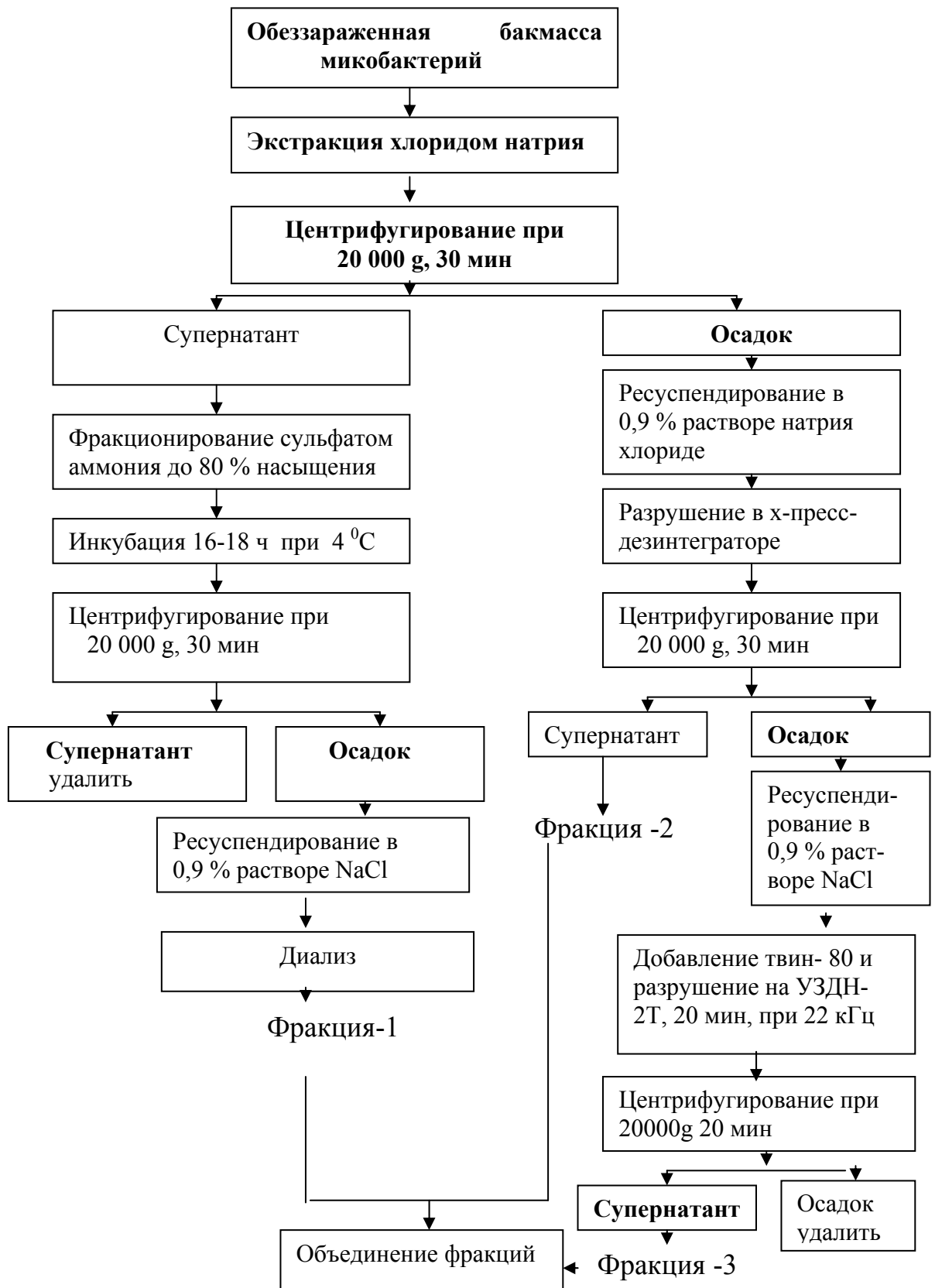
**Таблица 2. Характеристика антигенов туберкулёзного микроба**

<b>Фракции антигена (АГ)</b>	<b>Объём АГ, мл</b>	<b>Концентрация белка, мг/мл</b>	<b>Титр АГ в РИД</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Ф-1</b>	<b>34</b>	<b>28</b>	<b>1:32</b>
<b>Ф-2</b>	<b>32</b>	<b>23</b>	<b>1:32</b>
<b>Ф-3</b>	<b>43</b>	<b>13</b>	<b>1:64</b>

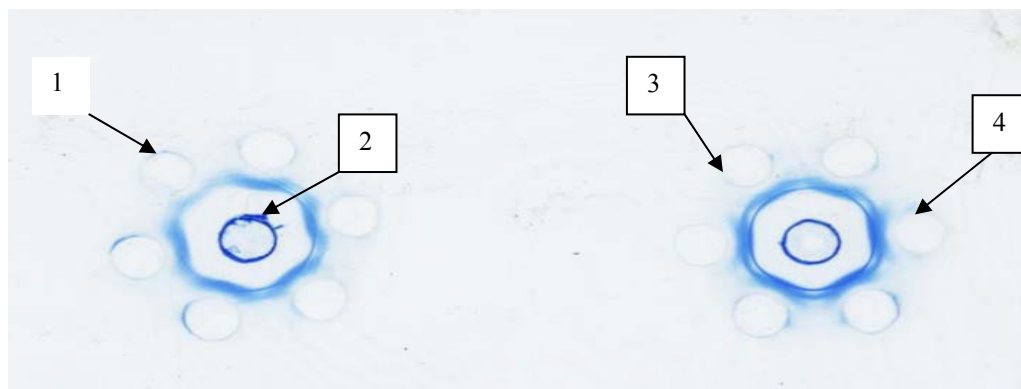
Как видно из таблицы 2, полученные из МТБ различными методами препараты содержали антигены, выявляемые в РИД.

Использование данного метода позволяет получать наиболее полный антигенный комплекс из бакмасс микобактерий туберкулёза с сохранением активности, снизить потери на стадиях выделения. Активность полученных антигенов в РИД с туберкулёзной иммунной сывороткой составляла 1:32-1:64 (рисунок 2).

В дальнейшем водорастворимый туберкулёзный антиген использовали для иммунизации животных и в качестве положительного контроля при конструировании диагностических тест-систем.



**Рисунок 1. Схема получения водорастворимых антигенных комплексов микобактерий туберкулёза**



**Рисунок 2. Реакция преципитации в агаровом геле**

Обозначения: 1- Аг *M. tuberculosis humanus* H 37 RA в разведении 1: 2 – 1: 64; 2 - сыворотка против *M. tuberculosis humanus*; 3- Аг *M. bovis* в разведении 1: 2 – 1: 64; 4 – сыворотка против *M. bovis*

Таким образом, нами подобран эффективный комплекс последовательных манипуляций, позволяющий изолировать в достаточном количестве полноценные антигенные фракции МТБ при сохранении их нативности.

Известные из данных литературы другие методы получения из МТБ антигенного материала путём ацетоновой и спиртовой экстракции не позволяют получить высокоактивный антигенный комплекс (Драбкина Р. Д. 1963).

### **3.2. Получение специфической туберкулёзной сыворотки**

Для получения туберкулёзных иммунных сывороток нами апробированы различные схемы иммунизации, которые отличались количеством и способом, кратностью вводимого антигена, а также адъювантами и иммунокорректорами (полный адъювант Фрейнда, феракрил, тималин, циклофосфан).

Общими недостатками схем иммунизации с применением адъювантов являются трудность создания стойкой эмульсии «вода в масле», длительность цикла иммунизации, травматичность для животных, связанная с возникновением у них адъювантной болезни.

Как показали результаты опытов, для получения гипериммунных туберкулёзных сывороток, наиболее приемлемой оказалась схема И.С.Тюменцевой (1994) с использованием феракрила в сочетании с комплексом антиген-антитело (Аг-Ат), который инъецировали животным на опреде-

лённом этапе: грундиммунизация включала пять последовательных парентеральных введений смеси туберкулёзного антигена с 3 % водно-спиртовым раствором феракрила с интервалами в 3-7 дней. Через 30 суток после последней инъекции антигена у животных брали из краевой вены уха кровь и получали не менее 4 мл иммунной сыворотки, в которую добавляли антиген с целью получения комплекса Аг-Ат. Основным циклом иммунизации состоял из четырёх внутривенных инъекций комплекса Аг-Ат через каждые 3-4 дня тому же животному, от которого была получена иммунная сыворотка. Специфические титры антител в этих сыворотках достигали в РИД - 1:32 - 1:64, что вполне удовлетворяло требованиям оценки сырья для дальнейшего получения различных диагностических препаратов.

При получении туберкулёзных агглютинирующих сывороток оптимальной оказалась схема Е.Н. Афанасьева (2000), в которой использованы вещества с иммуностропной активностью (тималин и циклофосфан). Антигенный материал пятикратно вводили внутривенно, одновременно внутримышечно инъецировали тималин, в третью инъекцию дополнительно вводили внутримышечно циклофосфан. Агглютинирующие сыворотки, полученные таким способом, с успехом были использованы при конструировании МИБП.

Из литературных данных следует, что возбудитель туберкулёза даёт перекрёстные серологические реакции с *Nocardia*, *Brucella*, *Listeria* и некоторыми нетуберкулёзными микобактериями. В связи с этим, идентификация МТБ и дифференциация с нетуберкулёзными микобактериями крайне важна для практического здравоохранения и проведения подходящей антибактериальной терапии. Для этого необходимо получить специфические туберкулёзные диагностические препараты, качество которых зависит от специфичности антител. Как правило, сыворотки, полученные иммунизацией животных, недостаточно специфичны, поэтому необходима сорбция антител, дающих перекрёстные реакции с гетерологичными антигенами. Для этих целей наилучшим способом является использование аффинного сорбента, который представляет собой гетерологичные антигены, закреплённые на твёрдой

матрице. Очистка сыворотки происходит за счёт биоспецифического взаимодействия между антигенами, закрепленными на матрице, и антителами, подлежащими удалению.

Известны методы сорбции сывороток путём внесения в неё корпускулярных гетерологичных антигенов (Карпов С.П. с соавт, 1976; Смирнов В.В. с соавт, 1980) и использование полиакриламидного антигенного аффинного сорбента (Лопаткин О.Н., Кронгауз И.В., 1983). В первом случае сорбция корпускулярными антигенами существенно понижает специфические титры антител, зачастую приводя к полной непригодности сырья из-за появления в нём экстрагируемого из бактериальных клеток материала. Во втором же случае, при приготовлении полиакриламидных сорбентов, используются высокотоксичные импортные реактивы, а специфическая ёмкость сорбента оказывается невысокой. В связи с этим мы поставили перед собой задачу получить и испытать аффинный сорбент из экологически чистых компонентов, упростить и ускорить все этапы сорбции при максимальной очистке сыворотки от гетерологичных антител.

Проведен контроль специфичности туберкулёзных сывороток на штаммах особо опасных инфекций, нетуберкулёзных микобактерий и нocardий. Так, например, на долю *Mycobacterium intracellulare* приходится около 90% микобактериозов лёгких (заболевания, сходные по клинической картине с туберкулёзом). Лечение при микобактериозах и туберкулёзе различается, что объясняется природной устойчивостью условно-патогенных микобактерий к основным средствам противотуберкулёзной терапии. Данные виды являются близкородственными по отношению к *M.tuberculosis*. *Nocardia brasiliensis* – патогенный представитель рода *Nocardia*, семейства *Nocardiaceae*, порядка *Actinomycetales*, общего с *M.tuberculosis*. В литературе встречаются данные о наличии у него общих антигенных детерминант с МТБ. Известно серологическое сходство полисахаридов *Brucella* и возбудителя туберкулёза, хотя по соотношению и набору моносахаридов и физико-

химическим свойствам эти полисахариды весьма различны (Домарадский И.В., 1994).

При контроле специфичности в НРИФ установлено, что наблюдаются перекрёстные реакции с *Brucella abortus*, *M. kansasii* Yoss, *Nocardia brasiliensis*, *M. intracellulare*. Из данных культур получали бакмассы, выделяли водорастворимые антигены по описанной схеме и использовали в качестве лигандов при получении аффинных сорбентов.

При конструировании аффинного сорбента мы исходили из того, что необходимо выбрать матрицу, обладающую химической и микробиологической устойчивостью, жёсткостью, высокой специфической адсорбционной способностью, найти способ щадящего и вместе с тем надёжного (ковалентного) закрепления на ней соответствующих лигандов.

Для этих целей нами применен аффинный сорбент с магнитными свойствами, где в качестве твердой фазы выступает кремнезем-алюмосиликат, который является мелкодисперсным наполнителем, представляющим собой комплексные анионы алюминия и кремния с избыточным отрицательным зарядом, компенсированным щелочноземельными металлами. Носитель обладает повышенными адгезионными свойствами по сравнению с полиакриламидом и силохромами. Кроме того, алюминирование кремнезёма существенно увеличивает адсорбционную активность в отношении белков (Хохлова Т.Д., Гаркавенко Л.Г., Никитин Ю.С., 1991).

Процесс получения сорбента заключался в следующем: к 1 г алюмосиликатного наполнителя добавляли 40 мл 3 % водного раствора полиглюкина и магнитный порошок ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) от 1 до 5 г, перемешивали и проводили гелеобразование при температуре  $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$  от 1 до 24 ч. Полученный сорбент высушивали при  $100-110^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, измельчали и методом отсева выделяли фракции с размером частиц 80- 120 мкм.

Процесс получения сорбента состоял из следующих стадий: образование золя, переход его в гидрогель и обезвоживание, приводящее к получению

ксерогеля. В золе мицеллы вещества свободно двигаются по законам броуновского движения. Сольватные оболочки мицелл, а так же поверхностный заряд препятствуют их слиянию, образованию прочных связей при столкновении и обеспечивают устойчивость золя. При повышении температуры происходит потеря гидратной оболочки мицелл, они связываются между собой силами сцепления в жёсткий каркас. Частицы укрупняются, контакты срастаются, что приводит к упрочнению скелета геля и уменьшению дисперсности частиц, в результате чего образуется ксерогель.

Удельную поверхность МС определяли по методу А.А.Клячко-Гурвича (1961), а суммарный объем и радиус пор - по методу Н.В.Кельцева (1984).

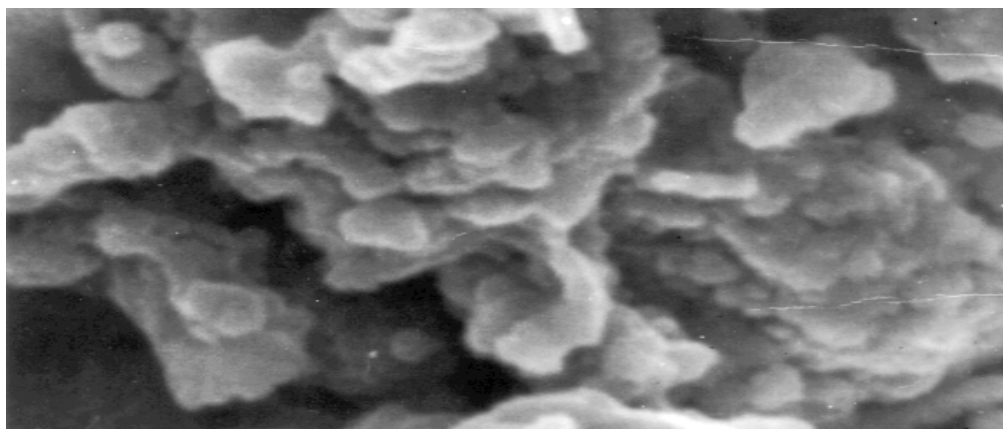
Для оптимизации структурных характеристик магносорбентов проведены исследования по варьированию состава компонентов синтеза (декстран,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , алюмосиликат), а также изучение влияния времени гелеобразования и pH среды на величину удельной поверхности сорбентов, объем и размер пор. Увеличение продолжительности времени гелеобразования при синтезе МС приводит к увеличению значений удельной поверхности и уменьшению размера пор. Стабилизирующий эффект действия декстрана объясняется образованием вокруг частиц геля сольватных оболочек в связи с возникновением комплексов между электронодонорными атомами кислорода молекул органического вещества и силанольными группами кремнеземных корпускул.

На наш взгляд, оптимальным значением времени гелеобразования при синтезе сорбентов является 1-2 часа, так как при увеличении времени синтеза магносорбента уменьшается радиус его пор, что приводит к снижению степени иммобилизации лиганда при ковалентном связывании в порах сорбента, стерическим препятствиям образования специфического комплекса антиген-антитело.

На основе проведенных исследований рекомендованы следующие оптимальные условия получения алюмосиликатных МС: соотношение компонентов синтеза  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , декстран, алюмосиликат 2:2:1, время гелеобразования 2 - час при pH - 7,0.

На рисунке 3 представлена фотография микроструктуры алюмосиликатного магносорбента, из которой следует, что у образца магносорбента наблюдается ярко выраженная губчатая структура.

Исследование удельной поверхности по методу А.А.Клячко-Гурвича (1961) показало, что введение магнитного порошка ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) в структуру кремнеземного сорбента изменяет его структурные характеристики: удельная поверхность в данном случае достигает  $18 \text{ м}^2/\text{г}$ , объем пор  $1,19 \text{ см}^3/\text{г}$ , радиус пор  $132,2 \text{ нм}$ , тогда как сорбент, не содержащий в своём составе  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , имеет удельную поверхность -  $58 \text{ м}^2/\text{г}$ , объем пор -  $1,70 \text{ см}^3/\text{г}$ , радиус пор -  $42,5 \text{ нм}$ .

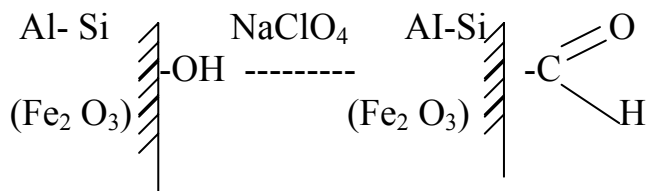


**Рисунок 3. Электронная микроскопия МС. Увеличение  $\times 10\,000$ .**

Магносорбенты были использованы далее для химического модифицирования активными группами, применяемыми для ковалентной иммобилизации лигандов, которая должна проводиться за счет функциональных групп, не влияющих на специфическую активность лиганда и в условиях, не допус-

кающих структурных изменений в белке (Шаханина К.Л. с соавт., 1978; Пушкарь В.Г. с соавт., 1984).

Для химического активирования данных магносорбентов нами использован метод модифицирования твердофазных носителей окислением (рис. 4).



**Рисунок 4. Схема получения магносорбента методом окисления**

Концентрация альдегидных групп активированных сорбентов составила 0,57 мг-экв/г. Достоверность и воспроизводимость аналитического метода определения альдегидных групп представлена в таблице 3.

**Таблица 3. Воспроизводимость экспериментальных данных при определении альдегидных групп в составе активированных магносорбентов**

Об- ра- зец	$C_i$ мг- экв/г	$C_i - C$	$(C_i - C)^2$	$S^2$	$S$	$E_{0,95}$	$E_{0,95}$ 100 % С	$C$ мг- экв/г
МИС	0,57	+0,01	$2,0 \times 10^{-4}$	$0,5 \times 10^{-4}$	$0,7 \times 10^{-2}$	$1,74 \times 10^{-2}$	3	$0,57 \pm 0,1$
	0,56	0						
	0,57	+0,01						
	1,70	+0,02						

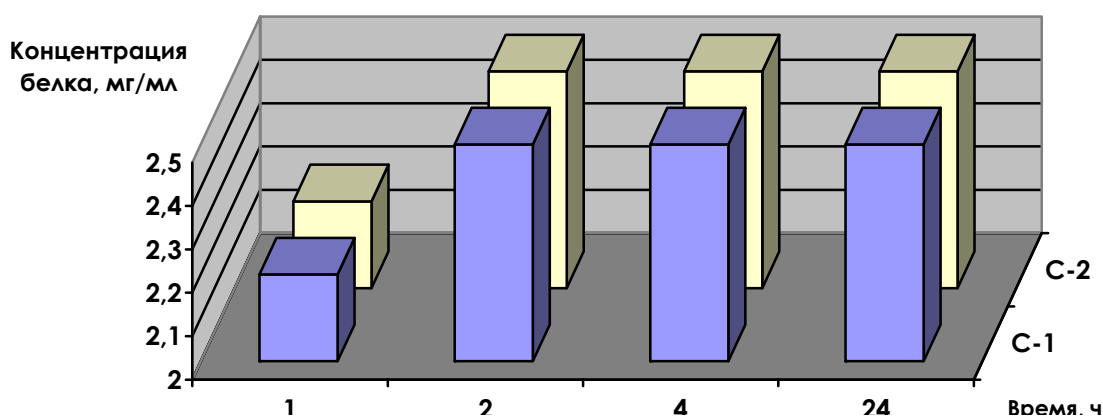
Далее проводили иммобилизацию гетерологичных водорастворимых антигенов (*Brucella abortus* 19, *Nocardia brasiliensis*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* Yoss) на сорбенты, для чего исследовали ряд параметров: концентрацию белка в антигенах, время и температуру инкубации, влияние pH на иммобилизацию лигандов.

Иммобилизацию лигандов на поверхности магносорбента проводили следующим образом: к 0,4 мл 10 % взвеси МС приливали 1 мл водорастворимых антигенов, варьируя количеством белка от 0,5 до 10 мг/мл, инкубацию

проводили в течение 1-24 часов, при температуре 4-5 °С;  $(22 \pm 4)$  °С и  $(37 \pm 1)$  °С. Далее надосадочную жидкость удаляли, а носитель промывали 0,9 % раствором хлорида натрия до полного удаления белка, наличие которого в промывной жидкости контролировали спектрофотометрически.

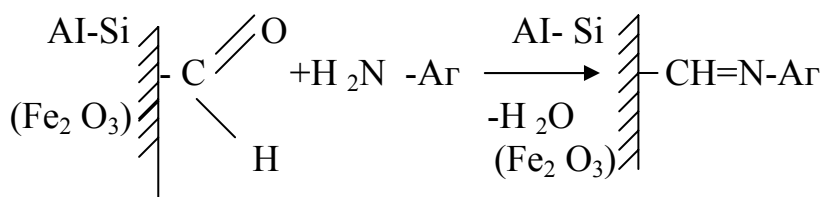
Для иммобилизации использовали различную концентрацию белка водорастворимых антигенов (0,5-10 мг/мл). Исследования показали, что концентрация белка 2,5 мг/мл является оптимальной для полного насыщения антигенами сорбента, находящегося в 10 % взвеси. При использовании лиганда с концентрацией белка больше 2,5 мг/мл адсорбционная емкость МИС снижалась. Вероятно, зависимость адсорбционной емкости сорбента от количества иммобилизуемого белка объясняется факторами стерического характера (Муромец В.И., Наградова Н.К., 1984).

Изучена кинетика процесса иммобилизации и оценка связывания выделенных антигенов с сорбентом. Из полученных данных следует (рис. 5), что 2 ч достаточно, чтобы произошло полное насыщение МС антигенами.



**Рисунок 5. Зависимость количества иммобилизованного белка от времени иммобилизации С-1-серия 1, С-2-серия 2**

Схема получения иммобилизованных антигенов на МС представлена на рис. 6.



**Рисунок 6. Схема получения МИС на декстраноалюмосиликагеле**

Ковалентное связывание водорастворимых антигенов с твердой матрицей осуществляется через альдегидную группу с образованием азометиновой связи.

При определении зависимости рН раствора водорастворимых антигенов на процесс иммобилизации установлено, что изменение рН от 5 до 9,5 не сказывается на специфической активности и чувствительности МИС.

Определена максимальная адсорбционная емкость сорбента, которая наблюдалась при температуре  $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$  и  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Таким образом, оптимальными факторами, способствующими получению МИС, являются: время иммобилизации лигандов на сорбенте - 2 часа при значении рН раствора водорастворимых антигенов 6-7 и температуры в интервале  $24 - 37 ^\circ\text{C}$ .

Методы получения иммуносорбентов просты и технологичны, исключая применение токсичных веществ. Полученные магноиммуносорбенты характеризуются стандартностью структурных характеристик, механической, химической и микробиологической устойчивостью, не подвержены набуханию, равновесие между антигенами и сорбентом наступает в течение 2 часов. Использование отечественных экологически чистых компонентов, их дешевизна, простота технологии изготовления свидетельствуют о достоинствах алюмосиликатных МИС.

Иммуносорбцию проводили дважды, соединяя 10 мл иммунной туберкулезной сыворотки с 1 г магноиммуносорбента. Смесь инкубировали при  $37 ^\circ\text{C}$  в течение 6 часов или при температуре  $4 ^\circ\text{C}$  - 16 часов на шуттель - аппа-

рате. После инкубации, используя постоянный магнит (при этом отпадает необходимость центрифугирования или фильтрования) для фиксации МИС, сыворотку сливали. Сорбент регенерировали 3 М раствором калия роданистого и отмывали 0,1 М фосфатно-солевым буфером pH ( $7,3 \pm 0,1$ ). Такой сорбент после процедур регенерации можно использовать до 10 - 15 раз. Магнитные свойства иммуносорбента позволили осуществлять отделение его от жидкой фазы в магнитном поле и исключить процесс длительного центрифугирования.

Титр антител и специфичность туберкулёзных сывороток, определяемые в НРИФ в мазках гомологичных и гетерологичных штаммов микроорганизмов, окрашенных иммуноглобулинами флуоресцирующими антикродичными, представлен в таблице 4.

Из таблицы видно, что до сорбции туберкулёзной сыворотки наблюдалась перекрестная реакция со штаммами *B.abortus*, *M. intracellulare*, *Nocardia brasiliensis*, *M. kansasii* Yoss при её активности 1:400 в реакции НРИФ. При сорбции иммунной сыворотки использование данного иммуносорбента позволило не только освободить препарат от неспецифических антител на одном этапе, но и сохранить первоначальную специфическую активность нативных сывороток.

Проведённые исследования дают основание утверждать, что применение алюмосиликатных антигенных магноиммуносорбентов позволяет проводить качественную иммуносорбцию. Преимуществами её являлось то, что при сорбции не происходило попадания в сыворотку антигенного материала и в ней отсутствовал комплекс «антиген-антитело», мешающий в дальнейшем созданию специфических диагностических систем.

Такая иммуносорбция приводила к повышению специфичности сывороток. Титры специфических антител не снижались и конечный продукт оставался качественным сырьем для дальнейшей работы.

**Таблица 4. Контроль специфичности и активности туберкулёзной иммунной сыворотки в НРИФ**

Мазки со взвесями культур	Визуальная оценка специфической люминесценции (по 4-х крестовой) в мазках, окрашенных иммуноглобулинами флуоресцирующими антикроличьими					
	До сорбции			После сорбции		
	1:200	1:400	1:600	1:200	1:400	1:600
<i>M. tuberculosis humanus H 37 RA</i>	44	44	33	44	44	33
<i>M. bovis BCG</i>	44	44	32	44	44	32
<i>M. intracellulare</i> # 23	44	32	22	22	--	--
<i>M. kansasii</i> Yoss	44	23	22	22	--	--
<i>Nocardia brasiliensis</i>	33	32	22	22	--	--
<i>B. abortus</i> 544, 19-BA	44	32	--	22	--	--
<i>B. abortus</i> 345	33	22	--	--	--	--
<i>B. melitensis</i> 16M, 565, Rev-1	--	--	--	--	--	--
<i>B. suis</i> 1330, 508, 6	--	--	--	--	--	--
<i>Salmonella typhi</i> 818, 4446	--	--	--	--	--	--
<i>Streptococcus faecalis</i>	--	--	--	--	--	--
<i>Staphylococcus epidermidis, aureus</i> ACCT 25923	--	--	--	--	--	--
<i>Listeria monocytogenes</i> 1 -7cepomun	--	--	--	--	--	--

Обозначения: -- - отрицательный результат, 2, 3, 4 - интенсивность свечения по 4-х крестовой шкале; 22, 32 - и т.д. - интенсивность свечения в двух повторных опытах.

Таким образом, нами разработана биотехнология получения аффинного сорбента с магнитными свойствами. В качестве матрицы использовали алюмосиликат - химически чистый сорбент, имеющий жёсткий остов, обладающий значительной адсорбционной ёмкостью, микробиологической и химической устойчивостью, механической прочностью. Для придания сорбентам биоспецифических свойств в структуру или на их поверхность иммобилизовали антигены путём ковалентной сшивки, т.е. образования химической связи при участии неспаренных электронов, принадлежащим обоим партнёрам по реакции (наиболее прочная связь). Для её осуществления нами ис-

пользован перхлорат натрия. В результате варьирования соотношением компонентов синтеза, отработки всех параметров: pH, температуры, времени, способов иммобилизации лигандов получены магноиммуносорбенты, пористая структура которых наиболее эффективна для образования иммунохимического комплекса «антиген – антитело». Наличие магнитного материала обеспечивает упрощение, ускорение манипуляций с сорбентами. Данные сорбенты отличаются простотой технологии изготовления, экологической чистотой, доступностью сырья и низкой стоимостью.

## **ГЛАВА 4. Получение иммуноферментных препаратов для экспресс-диагностики туберкулёза**

### **4.1. Получение иммунопероксидазного конъюгата**

Иммуноферментный анализ является наиболее перспективным при иммунодиагностике возбудителя туберкулёза у человека и животных. Однако внедрение его в широкую практику сдерживается значительным количеством ложноположительных результатов, обусловленных атипичными сапрофитными микобактериями и низкой чувствительностью при использовании туберкулиновых антигенов (Лопаткин О.Н., Кронгауз И.В., 1993).

Нами проведены исследования по получению высококачественных иммунопероксидазных конъюгатов для выявления микобактерий туберкулёза.

Для конструирования иммуноферментных диагностикумов использованы водорастворимые антигены микобактерий туберкулёза и гипериммунные сыворотки, полученные на их основе. Так как наблюдались перекрёстные реакции туберкулёзных сывороток с нетуберкулёзными микобактериями и сапрофитами, проведена их сорбция по технологии, представленной в главе 3. Иммуноглобулины из гипериммунных сывороток выделяли с помощью каприловой кислоты (Steibuch G., Andran R., 1969).

Для ковалентного связывания фермента - пероксидазы хрена («Сигма» США) с иммуноглобулинами выбран метод перйодатного окисления (Nakane P.K., Kawaoi A., 1974). Конъюгацию пероксидазы хрена с иммуноглобулинами осуществляли в два этапа: сначала получали активированное производное пероксидазы, содержащее альдегидные группы, далее проводили диализ. На втором этапе альдегидная группа пероксидазы, взаимодействуя с аминок группой антител, образовывала конъюгат, формируя азометиновую связь.

Краткое изложение биотехнологии получения конъюгата выглядит следующим образом: пероксидазу в количестве 5 мг растворяли в 1 мл 0,3 М

раствора натрия углекислого. Добавляли 0,025 мл 0,32 % раствора формалина, перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 минут, затем вносили 1 мл 0,04 М раствора периодата натрия и перемешивали. По истечении времени инкубации добавляли 1 мл 0,16 М раствора этиленгликоля и перемешивали 1 час. Все перечисленные операции проводили при температуре  $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$ . Затем раствор диализовали против 0,01 М КББ раствора pH 9,5 при  $4 ^\circ\text{C}$  в течение 18 часов. Раствор переносили во флакон, добавляли 1 мл туберкулёзных иммуноглобулинов с концентрацией от 2,5 до 10 мг/мл, перемешивали 2 часа при температуре  $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$  и вносили 5 мг боргидрида натрия, оставляя без перемешивания на 2 часа при  $4 ^\circ\text{C}$ . Раствор диализовали против 0,1 М ФСБ pH 7,2 в течение 18 часов при  $4 ^\circ\text{C}$ .

Очистку конъюгата от несвязавшегося фермента осуществляли методом гель-фильтрации с использованием сефадекса G-100 на установке ЛКВ-2137 (Швеция). В качестве элюата применяли 0,1 М ФСБ pH 7,2-7,4. Фракции собирали в объеме 3,0 мл и исследовали светопоглощение каждой из них при длинах волн 280 нм и 403 нм. Фракции, имеющие  $R_z$  (соотношение экстинций при длинах волн 403 и 280 нм – области максимального поглощения пероксидазы хрена и белка), равное 0,4 - 0,6, объединяли. Во фракции добавляли бычий сывороточный альбумин из расчета 10 мг на 1 мл. Фракции разливали в ампулы по 0,1 мл и лиофилизировали. В результате контроля активности установлено, что для иммобилизации достаточной является концентрация белка 5 мг/мл, так как при использовании 10 мг/мл показатель соотношения экстинции пероксидазы хрена и белка, а также активность препарата оставались на том же уровне при большем расходе белка (таблица 5).

Конъюгат лиофилизировали на лиофильной установке LZ-9C. Препарат был стабилен без потери активности в течение 1 года и соответствовал всем необходимым медико-биологическим требованиям.

**Таблица 5. Результаты взаимодействия белка с ферментом в зависимости от концентрации белка**

Серии пре-парата	Показатели	Концентрация белка, мг/мл		
		2,5	5	10
С-1	Rz	0,19	0,52	0,50
	Активность	1:25	1:600	1:6 00
С-2	Rz	0,28	0,39	0,38
	Активность	1:50	1:400	1:400
С-3	Rz	0,22	0,50	0,50
	Активность	1:25	1:800	1:800

Примечание: Rz - показатель соотношения экстинции при спектрофотометрии пероксидазы хрена при длине волны 403 нм и белка при 280 нм.

Полученные конъюгаты исследовали на активность, специфичность и чувствительность. Рабочий титр и специфическую активность конъюгатов определяли по методике M.Clark и A.Adams (1977) в “сэндвич”-варианте ИФА, оптимизируя некоторые параметры. В работе использовали полистироловые планшеты для иммунологических реакций Красноярского завода.

Планшеты сенсibilизировали туберкулёзными иммуноглобулинами в концентрации 100 мкг/мл в объеме 0,1 мл КББ pH 9,5, инкубировали 3 часа при температуре 37 °С. Несорбированные иммуноглобулины удаляли, в лунки вносили по 0,1 мл туберкулёзного водорастворимого антигена с концентрацией белка 0,1 мг/мл, инкубировали 1 час при температуре 37 °С.

Несвязавшиеся антигены удаляли, планшеты промывали 5-кратно по 3-4 мин 0,05 % раствором твин-20 в ФСБ и просушивали. Затем вносили по 0,1 мл разведенного пероксидазного конъюгата от 1:100 до 1:800, инкубировали 1 час при температуре 37 °С. После промывки добавляли по 0,1 мл свежеприготовленного субстрат-индикаторного раствора (0,1 М раствор лимонной кислоты с 0,2 М раствором натрия фосфорнокислого однозамещенного pH 5,0 в присутствии 0,006 % перекиси водорода и ортофенилендиамина в концентрации 0,4 мг/л) и инкубировали 10 мин при температуре

( $22 \pm 4$ ) °C без доступа света. Для остановки реакции использовали 2 М раствор серной кислоты. Результаты реакции учитывали визуально и на фотометре ПЭО ФЭК при длине волны 492 нм путем определения оптической плотности (ОП) проб, находящихся в лунках планшета. Результаты считали положительными, если ОП исследуемого образца в 2 и более раз превосходила среднее значение ОП отрицательных контролей.

Рабочий титр разработанных нами иммунопероксидазных туберкулёзных конъюгатов всех изготовленных серий составил 1:400–1:800 с соответствующими штаммами. Чувствительность конъюгатов по водорастворимым антигенам – 50 – 100 нг/мл.

Все серии полученных конъюгатов для ИФА дали отрицательные результаты с гетерологичными штаммами (таблица 6), что свидетельствовало об их специфичности.

Кроме того, для оценки чувствительности и специфичности конъюгатов в качестве тест-объектов использовали взвеси клеток туберкулёзных штаммов. За рабочее разведение конъюгата принимали такое максимальное разведение последнего, при котором в ИФА выявлялось минимальное количество клеток возбудителя при отсутствии окрашивания контроля. Чувствительность иммунопероксидазных конъюгатов по корпускулярным антигенам составила  $5 \times 10^4$  –  $1 \times 10^5$  м.к./мл (таблица 6).

Лабораторные испытания экспериментальных серий иммунопероксидазных конъюгатов показали, что они отвечают ОМБТ, предъявляемым к таким препаратам (таблица 7).

На основе полученных препаратов были сконструированы тест-системы для экспресс-диагностики возбудителя туберкулёза, состоящие из 1 ампулы иммуноферментного конъюгата, 1 ампулы положительного контроля (взвесь туберкулёзного микроба)-  $10^9$  м.к./мл, 1 ампулы иммуноглобулинов туберкулёзных и необходимых ингредиентов для постановки ИФА (ФСБ,

твин-20, БСА, 2 М раствора серной кислоты, ортофенилендиамина, таблетки гидроперита (перекись водорода).

**Таблица 6. Результаты по определению активности, чувствительности и специфичности иммунопероксидазных конъюгатов**

№№ пп	Наименование штаммов микроор- ганизмов	Серии иммунопероксидазных конъюгатов					
		С-1		С-2		С-3	
		рабо- чий титр	чувстви- тель- ность м.к./мл	рабочий титр	чувстви- тель- ность м.к./мл	рабо- чий титр	чувст- витель- ность м.к./мл
1.	<i>M. tuberculosis hu- manus H 37 RA</i>	1/600	$5 \times 10^4$	1/800	$1 \times 10^5$	1/600	$5 \times 10^4$
2.	<i>BCG</i>	1/600	$1 \times 10^5$	1/400	$5 \times 10^4$	1/600	$1 \times 10^5$
3.	<i>M. kansasii</i> Yoss		Отр.		Отр.		Отр.
4.	<i>M. intracellulare</i> #2		Отр.		Отр.		Отр.
5.	<i>Nocardia brasiliensis</i>		Отр.		Отр.		Отр.
6-16	<i>Br. melitensis</i> 16-M, 565, Rev-1, <i>Br. abor- tus</i> 544; 19-BA,345, <i>Br. suis</i> 1330; 508, 6		Отр.		Отр.		Отр.
17-18	<i>Salmonella typhi</i> 818, 4446		Отр.		Отр.		Отр.
19.	<i>Streptococcus faecalis</i>		Отр.		Отр.		Отр.
20	<i>Staphylococcus epi- dermidis</i>		Отр.		Отр.		Отр.
21-27	<i>Listeria monocyto- genes</i> 1 –7 серотип		Отр.		Отр.		Отр.

**Таблица 7. Характеристика иммунопероксидазных конъюгатов**

Критерии оценки	Серии		
	1	2	3
Внешний вид	компактная пористая таблетка белого цвета		
Растворимость	в 1 мл дистиллированной воды в течение 1 мин.		
Прозрачность	раствор прозрачен		
Цветность раствора	бесцветный или слегка желтоватого цвета		
pH	7,2	7,1	7,4
Потеря в массе при высу- шивании	2,2	2,3	2,1
Rz – количественное соот- ношение фермент /белок	0,52	0,48	0,43
Активность	1:600	1:800	1:800
Чувствительность	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$

На первом этапе конструирования иммуноферментного конъюгата провели подбор оптимальных условий получения препарата, в качестве лиганда используя иммуноглобулины туберкулёзные, полученные из адсорбированной сыворотки. Второй этап работы - оптимизация постановки анализа. Третий этап - конструирование тест-систем для экспресс-диагностики.

Одной ампулы с препаратом в объеме 0,1 мл с активностью-1:600 достаточно для проведения 300 иммуноферментных анализов с дубликатом.

Таким образом, в результате проведённых исследований получены высокоактивные (до 1:800), специфичные (отсутствуют перекрёстные реакции с гетерологичными штаммами) иммуноферментные конъюгаты, позволяющие выявлять МТБ от  $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  м.к./мл.

#### **4.2. Получение липосом и липосомально-иммунопероксидазного конъюгата**

Липосомы получали из фосфолипидов и ганглиозидов, выделенных из мозга к.р.с., а в последнее время из мозга свиньи (ТУ 9154-00-01897080-2004), не являющегося потенциально опасным при губчатой энцефалопатии животных (коровье бешенство). Разработанная биотехнология выделения сырья для приготовления липосом включала следующие этапы:

1. Головной мозг животного в количестве 1000 г гомогенизировали в 4000 мл охлаждённого до минус 20 °С ацетона, периодически перемешивая в течение 12 ч. Суспензию фильтровали на воронке Бюхнера, осадок вновь суспендировали в 2000 мл охлаждённого ацетона в течение 4 часов и повторно фильтровали на воронке Бюхнера.
2. Для извлечения фосфолипидов и ганглиозидов полученный осадок экстрагировали 2000 мл смеси хлороформ - этанол (1:1) при встряхивании на шуттеле в течение 1 ч при температуре 20 °С. На этом этапе мы использовали указанную экстрагирующую смесь в отличие от традиционной, высокотоксичной смеси, включающей хлороформ и метанол.

Если традиционный метод выделения фосфолипидов требует удаления экстрагирующего раствора на роторном испарителе, то нами фосфолипиды осаждались из него при добавлении 1,5-2 объёмов охлаждённого ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) ацетона. При этом осаждался и холестерин, необходимый для стабилизации липосом в процессе их приготовления. Данный способ выделения фосфолипидов защищён патентом РФ № 2192265 от 10.10.2002.

3. Осадок фосфолипидов, собранный при фильтровании, высушивали при комнатной температуре до постоянного веса. Выход препарата составил 1,4 % от массы исходного сырья. В дальнейшем препарат растворяли в хлороформе (50 мг/мл) и хранили в сосуде с притёртой пробкой в темноте под подушкой инертного газа (азота) при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ .

Для предотвращения перекисного окисления липидов в процессе приготовления липосом в их хлороформный раствор вносили 0,05 %  $\alpha$ -токоферола.

4. При внесении в надосадочную жидкость, образующуюся после изоляции из органической смеси фосфолипидов, дополнительно охлаждённого ацетона до 5 объёмного соотношения, в осадок выпадала фракция ганглиозидов, также используемая нами при конструировании липосом. Способ получения ганглиозидов защищён патентом РФ № 2195296 от 27.12.2002.

Высушенный осадок ганглиозидов растворяли в хлороформе (50 мг/мл) и хранили в условиях, аналогичных хранению фосфолипидов. Разработанная биотехнология выделения фосфолипидов и ганглиозидов представлена на рис. 7.

Хроматографическое изучение полученного препарата фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Силуфол» в системе растворителей хлороформ-метанол-вода (65:25:4) с использованием в качестве свидетелей тест-наборов стандартов фосфолипидов и холестерина показало наличие в нём преимущественно фосфотидилхлолина, фосфотидилсерина, фосфотидилинозита и холестерина, которые выявлялись при прокрашивании парами йода (Кейтс М., 1975).

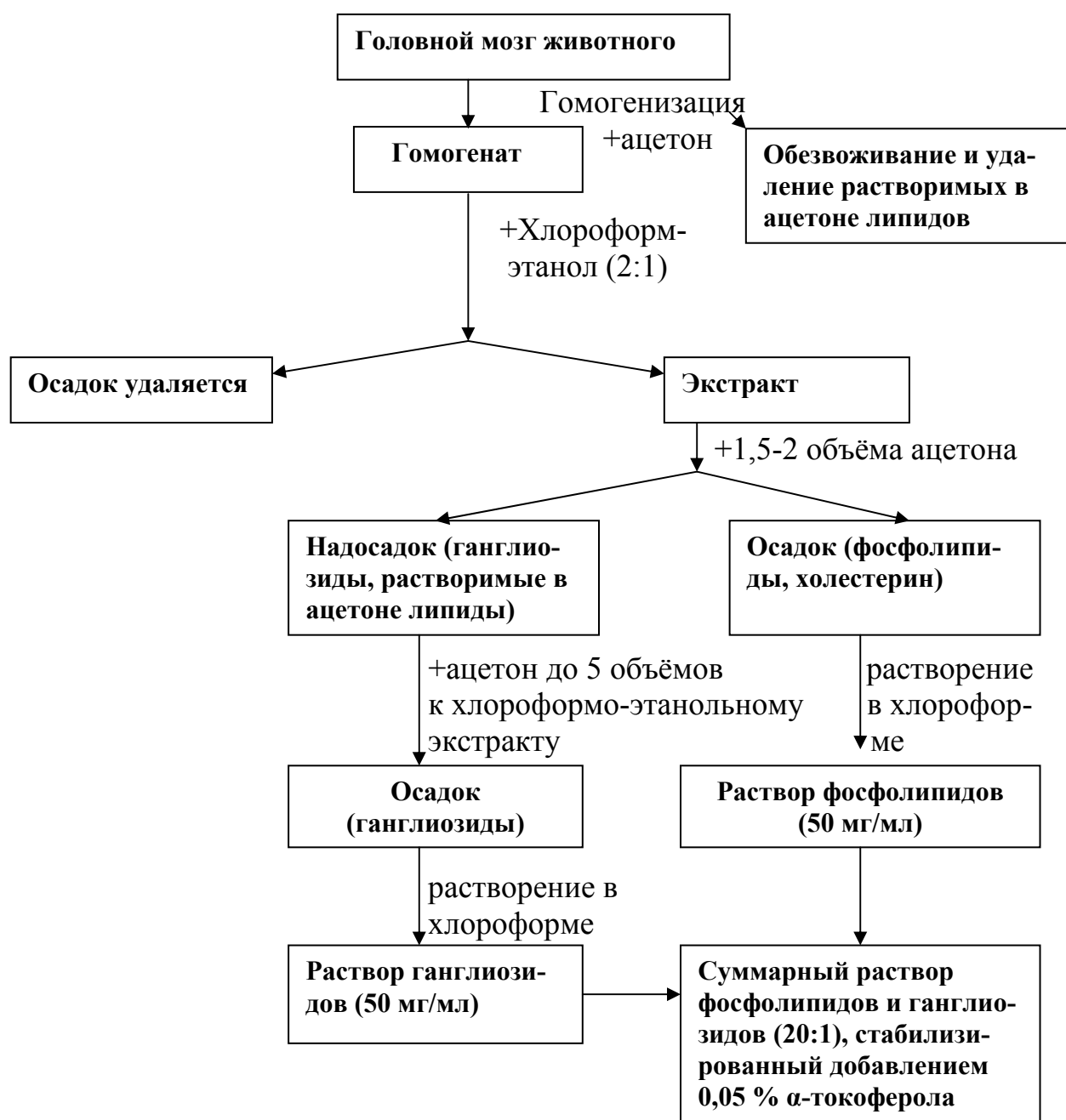


Рисунок 7. Биотехнологическая схема выделения фосфолипидов и ганглиозидов из головного мозга животных

Липосомы получали методом «выпаривания в обращённой фазе» согласно методическим рекомендациям «Иммобилизация в липосомы веществ различной химической природы. Стерилизация и стабилизация липосом» (2000 г.), используя в качестве сырья для их приготовления хлороформные растворы фосфолипидов и ганглиозидов в соотношении 20:1.

С этой целью в хлороформную смесь указанных липидов дополнительно вносили хлороформ до достижения липидной концентрации 30 мг/мл. К 3 мл этого раствора добавляли 1 мл водной фазы в виде 0,01 М ФСБ pH 7,2, содержащего 0,01 % хлористого кальция. Для исключения негативного влияния ультразвука на липиды, которые при этом интенсивно окисляются, полученную смесь перемешивали в течение 10-12 мин на скоростной мешалке до образования стойкой эмульсии типа «вода в масле». Затем эмульсию упаривали в вакууме на роторном испарителе при температуре нагревающей жидкости 45 °С, не допуская кипения и вспенивания смеси, до полного удаления органической фазы. В дальнейшем колбу снимали с испарителя, к образовавшемуся гелю добавляли 5 мл 0,01 М ФСБ pH 7,2 и интенсивно встряхивали в присутствии стеклянных бус до образования гомогенной структуры липосом. Контроль образования и размеров липосом осуществляли с помощью электронного микроскопа при инструментальном увеличении  $\times 5000-50000$ . Для этого на сетку-подложку, покрытой формваровой плёнкой, с помощью бактериологической петли наносили взвесь полученных липосом, предварительно разводя их 0,01 М ФСБ pH 7,2 до получения суспензии, хорошо просматривающейся при электронной микроскопии. После нанесения взвеси на сетку избыток удаляли фильтровальной бумагой. Липосомы, находящиеся на сетке, контрастировали 1 % водным раствором уранилацетата, который наносили бактериологической петлёй.

В результате изучения полученных препаратов на электронном микроскопе были обнаружены липосомы со средним размером 150-300 нм, который рассчитывали по формуле:  $D = (\sum n \cdot D_v / \sum n)^{1/3} \cdot K^{-1}$ , где  $D$  – средний диаметр липосом в препарате (мкм);  $D_v$  – средний размер липосом в каждой группе (мкм);  $n$  – число липосом в каждой группе;  $K$  – коэффициент увеличения, включая инструментальное увеличение микрофотографий.

Полученные липосомы были использованы в качестве «твёрдой» фазы при получении иммуноферментного препарата для диагностики МТБ. Кова-

лентно фиксируясь на поверхности мембраны липосом, фермент и иммуноглобулин резко снижают способность к конформационным изменениям структуры своих молекул под воздействием повышенной температуры, изменениях pH среды и т.д. Всё это способствует повышению стабильности и увеличению срока годности диагностической системы.

Для получения диагностикума мы предварительно активировали пероксидазу хрена. С этой целью ( $5 \pm 0,1$ ) мг пероксидазы хрена растворяли в 1 мл раствора натрия углекислого кислого в концентрации 0,3 моль/л, добавляли 0,025 мл 0,32 % раствора формалина. Смесь перемешивали на мешалке в течение ( $30 \pm 5$ ) мин при температуре ( $22 \pm 4$ ) °C и добавляли 1 мл раствора перйодата натрия в концентрации 0,04 моль/л, продолжая перемешивать в течение ( $30 \pm 5$ ) мин при температуре ( $22 \pm 4$ ) °C. Далее вносили 1,0 мл раствора этиленгликоля в концентрации 0,16 моль/л (для снижения поверхностного натяжения), осторожно перемешивая в течение ( $60 \pm 5$ ) мин при температуре ( $22 \pm 4$ ) °C. В конце процедуры препарат активированной пероксидазы должен быть жидким, прозрачным, без запаха, зеленовато-коричневой окраски. Активированную пероксидазу переносили в диализный мешок и диализовали против 1 л 0,01 М КББ pH ( $9,55 \pm 0,05$ ), в течение ( $19 \pm 1$ ) ч на мешалке при температуре 2-8 °C в холодильной камере. Данная процедура приводила к образованию альдегидных групп в углеводной части фермента пероксидазы.

В дальнейшем на наружной мембране липосом последовательно фиксировали пероксидазу хрена и туберкулёзные иммуноглобулины класса G. С этой целью к 5 мг окисленной перйодатным методом пероксидазы добавляли 1 мл суспензии липосом в 0,01 М КББ pH 9,5, содержащей 18 мг липидов.\*

Суспензию подвергали в течение 1 мин ультразвуковой обработке, обеспечивающей эффективный контакт поверхности липидной мембраны липо-

---

\* Работа выполнялась совместно со с.н.с. СтавНИПЧИ Зайцевым А.А., гл.спец. Диковой С.П. и гл.спец. Головченко Т.В.

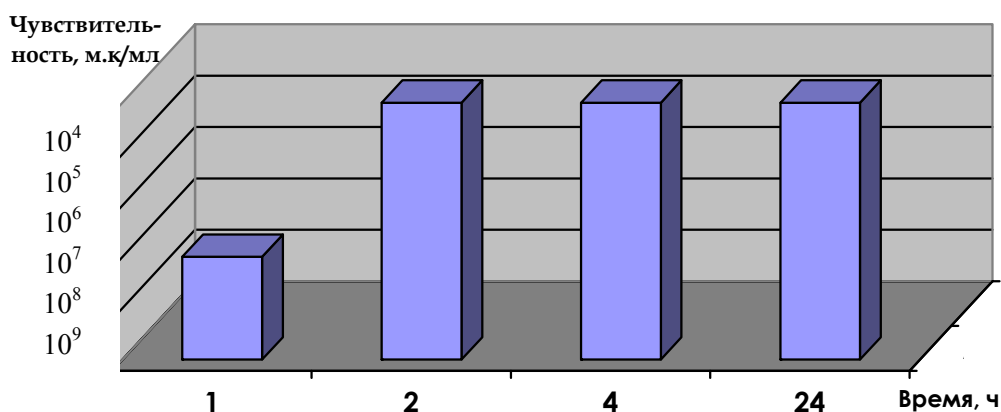
сом с ферментом, после чего смесь инкубировали при комнатной температуре 1 ч. Ковалентное связывание липосом с ферментом осуществлялось за счёт части активированных групп пероксидазы и аминокрупп, присутствующих в молекулах ганглиозидов, встроенных в мембрану липосом при их приготовлении.

Несвязавшуюся пероксидазу удаляли хроматографически, используя колонку 100x12 мм с сефадексом G-100, уравновешенную 0,01 М КББ pH 9,5. В первом пике экстрагировались активированные ферментом липосомы, во втором – несвязавшийся фермент. Фракции первого пика объединяли и к ним добавляли туберкулёзные иммуноглобулины Ig G в количестве от 2,5 до 10 мг/мл. Фиксацию иммуноглобулинов на поверхности липосом с иммобилизованной пероксидазой хрена проводили при температуре  $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ , помещивая на шуттеле в течение 1-24 ч и стабилизировали 5 мг боргидрида в холодильнике при температуре  $(4-6)^\circ\text{C}$ . При этом иммуноглобулины за счёт свободных аминокрупп связывались с оставшимися свободными альдегидными группами углеводной части пероксидазы. Для очистки конъюгата от несвязавшихся иммуноглобулинов использовали гель-хроматографию. Конъюгат наносили на колонку 100x12 мм с сефадексом G-100, уравновешенную ФСБ в концентрации 0,1 моль/л, pH  $(7,2 \pm 0,1)$ . В результате происходило фракционирование исходной смеси молекул на зоны в зависимости от их размеров. Поэтому в первом пике (свободном объёме колонки) выходил конъюгат, далее несвязавшиеся иммуноглобулины. Элюцию проводили тем же буферным раствором, фракции собирали по 2,0 мл и исследовали поглощение каждой фракции визуально по мутности раствора и на спектрофотометре при двух длинах волн – 280 и 403 нм. Фракции, имеющие отношение  $A_{403}/A_{280}$ , равное 0,4-0,5, объединяли и к готовому препарату добавляли до 1 % БСА.

Установлено, что наиболее высокочувствительный липосомальный иммуноферментный диагностикум был получен при концентрации белка им-

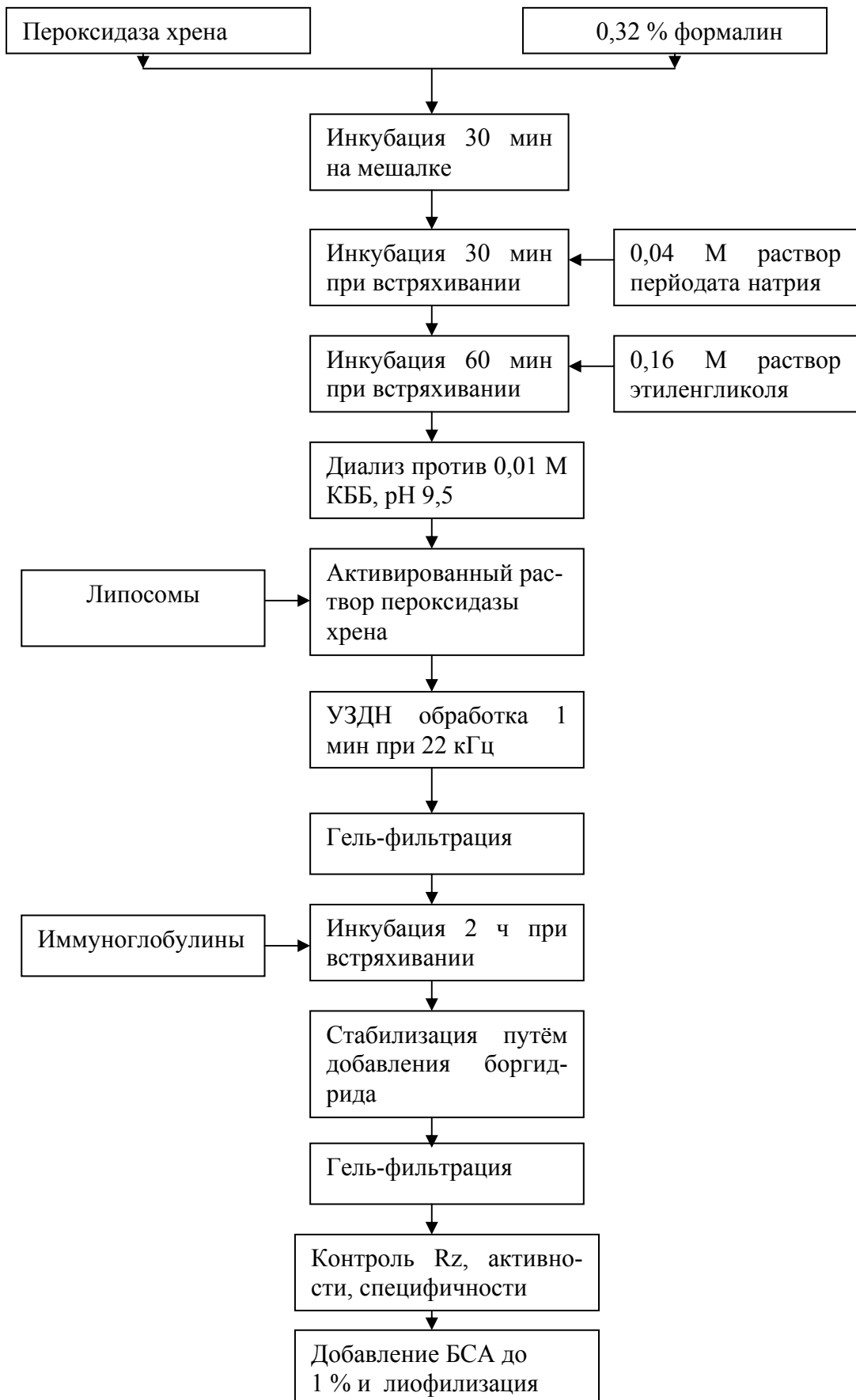
муноглобулинов 5 мг/мл и времени их инкубации с липосомальным ферментным конъюгатом 2 ч (рис.8).

Для увеличения срока годности препарат разливали в ампулы, замораживали и лиофилизировали в течение  $(18 \pm 2)$  ч до конечной температуры  $25^{\circ}\text{C}$ . В готовом препарате контролировали физико-химические (растворимость, цветность, прозрачность, потерю в массе при высушивании) и иммунологические свойства (активность, специфичность, чувствительность) после лиофилизации и в процессе хранения в течение 2 лет (срок наблюдения). Чувствительность и специфичность конъюгата определяли в ИФА аналогично способу, описанному выше, с гомологичными и гетерологичными штаммами.



**Рисунок 8. Зависимость чувствительности липосомального иммуноферментного диагностикума от времени иммобилизации туберкулёзных иммуноглобулинов**

Биотехнологическая схема получения липосомального иммуноферментного диагностикума представлена на рисунке 9.



**Рисунок 9. Биотехнологическая схема получения липосомального иммуноферментного диагностикума**

В таблице 8 представлены результаты анализов физико-химических свойств и чувствительности препарата. Разработанные препараты удовлетворяют требованиям нормативных документов, а их стабильность превосходит традиционные иммуноферментные конъюгаты.

**Таблица 8. Свойства лиофилизированного липосомального иммуноферментного диагностикума в процессе хранения**

Серия препарата	Потеря в массе при высушивании	Срок наблюдения					
		1 год		1,5 года		2 года (срок наблюдения)	
		Растворимость и внешний вид	Чувствительность	Растворимость и внешний вид	Чувствительность	Растворимость и внешний вид	Чувствительность
1	2,6	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^5$	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^5$	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^5$
2	2,6	1 мин Раствор белого цвета	$5 \times 10^4$	1 мин Раствор белого цвета	$5 \times 10^4$	1 мин Раствор белого цвета	$5 \times 10^4$
3	2,5	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^5$	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^5$	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^5$

Таким образом, в результате проведённых исследований разработана биотехнология изготовления иммобилизованного ферментного препарата, значительно увеличивающая его стабильность.

Материалы научных разработок легли в основу методических рекомендаций: «Иммобилизация в липосомы веществ различной химической природы. Стерилизация и стабилизация липосом», утвержденных Первым зам. министра здравоохранения РФ, Главным Государственным санитарным врачом России Г.Г. Онищенко 06.04.2000 г.

На Федеральном уровне утвержден нормативный документ (НД): технические условия (ТУ) 9154-00-01897080-2004 на фосфолипиды для получения липосом. Утверждены зам. Главного Государственного санитарного врача РФ Е.Н. Беяевым (Письмо № 12 ФЦ/ 2514 А от 19. 08. 2004 г).

На учрежденческом уровне утвержден регламент на липосомальную основу для получения диагностических, лекарственных и косметических препаратов (протокол Учёного Совета СтавНИПЧИ № 4 от 20.04.04).

## **ГЛАВА 5. Получение туберкулёзных суспензионных диагностикумов.**

### **5.1. Биотехнология изготовления латексного диагностикума**

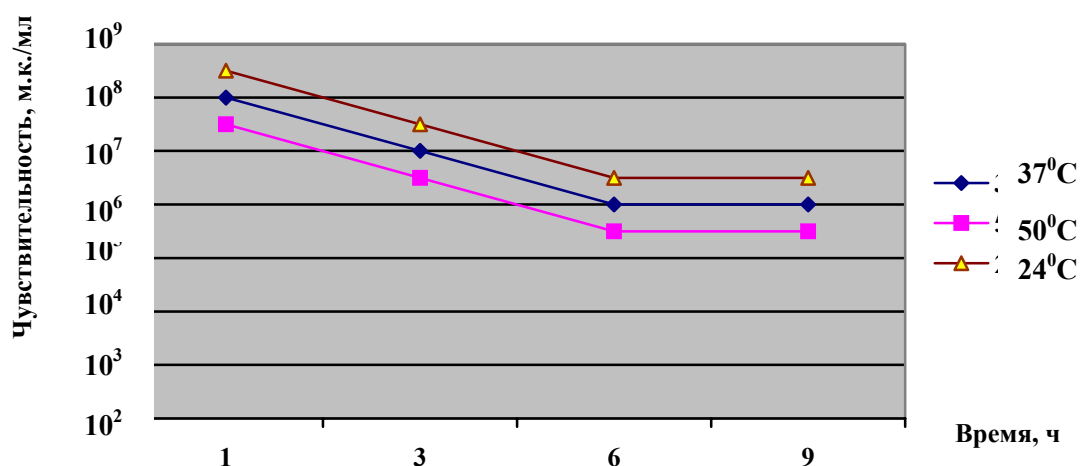
Реакция агглютинации латекса (РАЛ) известна давно. Данная реакция по своему механизму аналогична реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), но химические свойства латексных микроносителей относительно постоянны и поддаются более легкой и точной характеристике по сравнению с поверхностными структурами наружной мембраны эритроцитов, которые широко варьируют в зависимости от многих условий, таких как пол, возраст, гормональный статус животного-продуцента, время взятия крови, источника выделения и методов предварительной обработки. Поэтому латексные микроносители обеспечивают более воспроизводимые результаты по сравнению с эритроцитами и могут с успехом их дополнять или заменять в методах иммуноанализа. Преимущество латексных (полиакролеиновых) систем перед другими микросферами обеспечивается наличием альдегидных групп на поверхности латексных частиц, легко образующих ковалентную связь с аминок группами белков.

При выполнении настоящего раздела работы перед нами стояли следующие задачи: оптимизировать условия иммобилизации лигандов на синтетический носитель (использовав иммуноглобулины из адсорбированных туберкулёзных сывороток, подобрав количественные, температурные, временные параметры и рН при сенсibilизации); разработать условия стабилизации, подобрать рН и разводящую жидкость, необходимую при постановке реакции агглютинации латекса (РАЛ).

Для приготовления иммуноглобулиновых диагностикумов использовали агглютинирующие туберкулёзные кроличьи сыворотки, адсорбировали их иммобилизованными на магноиммуносорбентах гетерологичными водорастворимыми антигенами, как описано ранее, и фракционировали иммуноглобулины каприловым методом.

Латексную основу – акролар К (ТУ 6-69-10-1824-88) получали из института биоорганической химии им. Шемякина. Латекс окрашен в малиновый цвет, со средним диаметром частиц  $(1,2 \pm 0,1)$  мкм. Для сенсibilизации матрицы использовали иммуноглобулины туберкулёзные с концентрацией белка от 100 до 1000 мкг/мл. Лиганд соединяли с 2 мл 2% полимерного носителя. К этим смесям добавляли 2 мл забуференного физиологического раствора pH  $(7,2 \pm 0,1)$ . Сенсibilизацию проводили в течение 1, 3, 6, 9, 12 часов при температуре  $(24 \pm 4)^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  и  $50^\circ\text{C}$  на магнитной мешалке \*.

Далее суспензию осаждали центрифугированием при 5 000 g в течение 4-5 минут и дважды отмывали от несвязавшегося лиганда забуференным физиологическим раствором pH  $(7,2 \pm 0,1)$ . Осадок суспендировали в белковом стабилизаторе (растворённом 1:50) до концентрации 0,2 % с 0,1 % формалина. Оптимальная нагрузка иммуноглобулинов составляла 400 мкг/мл (при увеличении нагрузки белка отсутствовал отрицательный контроль, при уменьшении - снижалась чувствительность), время сенсibilизации 6 ч, температура –  $50^\circ\text{C}$  (рис. 10).



**Рисунок 10. Зависимость чувствительности латексного диагностикума от времени и температуры сенсibilизации лиганда**

\*Работа выполнялась совместно со с.н.с. СтавНИПЧИ Зайцевым А.А.

Диагностическую ценность препаратов оценивали в реакции агглютинации латекса (РАЛ) в U-образных микропланшетах. В качестве разводящей жидкости использовали белковый стабилизатор (состоящий из 1 части белка куриного яйца, 4 частей раствора натрия двууглекислого, нейтрализованного 1 Н раствором соляной кислоты) с твин-80. Перед употреблением белковый стабилизатор разводили в 50 раз на 0,9 % растворе хлорида натрия, pH  $(7,2 \pm 0,1)$  и смешивали с твин-80 до конечного разведения последнего 1:80 000. Подбор концентрации детергента (твин –80) очень важен, так как при его увеличении чувствительность диагностикума снижалась, а при уменьшении концентрации твин- 80 отсутствовал отрицательный контроль. На постановку реакции влияние оказывал pH разводящей жидкости. При уменьшении pH до 5,0 уменьшалась активность препаратов, при увеличении pH до 9,0 отсутствовал отрицательный контроль.

Постановку РАЛ микрометодом проводили следующим образом: в 8 рядов полистироловой пластины дозаторами вносили по 0,05 мл разводящей жидкости. Дозатором или иглой микротитратора, имеющей головку объемом 0,05 мл, в первые лунки 7 рядов добавляли исследуемый материал, а в первую лунку 8 ряда – взвесь микробных клеток в концентрации  $5 \times 10^7$  м.к./мл. Делали последовательные двукратные разведения переносом по 0,05 мл из одной лунки в другую по 7-ю лунку включительно. Из последних лунок по 0,05 мл удаляли. 8-е лунки использовали для контроля диагностикума. Затем во все лунки добавляли по 0,025 мл диагностикума полиакролеинового (латексного) иммуноглобулинового 0,2 % концентрации. Содержимое пластины осторожно встряхивали до получения гомогенной суспензии и оставляли при комнатной температуре на  $(2,5 \pm 0,5)$  ч.

Учет результатов (по феноменам "зонтик", "пуговка") предварительно учитывали через  $(2,5 \pm 0,5)$  ч, а окончательно - через 16 - 18 ч. Результат РАЛ считали положительным, когда полиакролеиновые микросферы выпадали на дно лунок равномерным слоем в виде «зонтика», занимая не менее 2/3

диаметра сферической поверхности дна лунки. При отрицательном результате полиакролеиновые микросферы выпадали на дно лунки в виде "пуговки" или узкого колечка с ровным краем. В контрольных лунках результат должен быть отрицательным.

При контроле чувствительности диагностикумов иммуноглобулиновых в планшетах использовали взвеси микобактерий туберкулёза в концентрациях от  $5 \times 10^7$  до  $1,95 \times 10^5$  м.к./мл. В результате постановки реакции установлено, что чувствительность разработанных диагностикумов составила  $3,9 \times 10^5$  -  $7,8 \times 10^5$  м.к./мл. При изучении специфичности в РАЛ на гетерологичных штаммах (в концентрации  $1 \times 10^7$  и ниже) перекрёстных реакций не выявлено.

Проведенные исследования показали, что по чувствительности и специфичности полученные препараты в реакции агглютинации латекса удовлетворяют требованиям нормативных документов.

Изготовлено 5 серий диагностикумов туберкулёзных полиакролеиновых (латексных) иммуноглобулиновых. При проведении статистической обработки по методу Е.П. Тамбовцева с соавт.(1969), в серии опытов титр РАЛ  $\bar{t}$  равен  $5,2 \times 10^5$  м.к./мл (+14,1 %; -12,3 %).

Таким образом, проанализировав литературные данные и проведя экспериментальные исследования биотехнологии изготовления туберкулёзных латексных иммуноглобулиновых диагностикумов, нами отработаны оптимальные условия, включающие использование иммуноглобулинов для сенсibilизации из адсорбированных туберкулёзных сывороток, нагрузку иммуноглобулинов -400 мкг/мл; время сенсibilизации 6 часов при температуре -  $50^{\circ}\text{C}$  и pH раствора при сенсibilизации и постановке анализа -  $7,2 \pm 0,1$ .

## **5.2. Разработка биотехнологии получения алюмосиликатного диагностикума**

В последние годы медицина обогатилась новыми методами исследований, в которых используются новейшие достижения биотехнологии, одним из

которых является разработка и внедрение иммобилизованных биосистем. Приобретение последними биоспецифических качеств достигается путём иммобилизации в структуре или на поверхности матрицы различных лигандов (иммуноглобулинов, бактериальных клеток или их антигенов и т.д.). Адсорбция лигандов на данных системах зависит от химического строения сорбентов и условий иммобилизации, которая, осуществляясь на твёрдых носителях, приводит к значительному повышению термической устойчивости и стабильности лигандов.

Для получения иммуносорбентного препарата для экспресс-диагностики микобактерий туберкулёза изучены условия сенсibilизации матрицы антителами, стабилизации сенсibilизированных суспензий и стандартизации полученных диагностикумов. В работе использовали типичные штаммы возбудителя туберкулёза, из биомассы которых извлекали антигенные комплексы, используя их для получения иммунных сывороток (по схеме Е.Н. Афанасьева, 2000 г.) и постановки реакций как описано ранее.

Первостепенной задачей при разработке иммуносорбентных диагностикумов является выбор матрицы с оптимальными характеристиками по отношению к фиксируемым биомолекулам. Нами выбран алюмосиликат, так как для данного кремнезема характерна высокая реакционная способность поверхностных групп при взаимодействии со многими веществами.

Введение в матрицу красителя обуславливает цветовой эффект, в результате чего повышается наглядность серологического теста. В качестве красителя использовали аурамин.

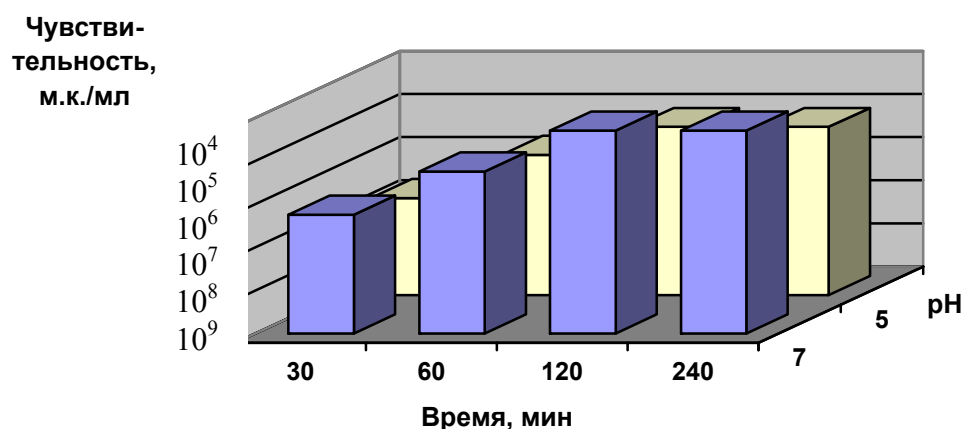
Следующей задачей был выбор способа активирования матрицы для иммобилизации лиганда и достижения агрегативной устойчивости суспензии. Для данной цели нами использовано поверхностно-активное вещество (ионный детергент)- вторичный алкилсульфат натрия, благодаря которому предотвращается сближение частиц, их агрегирование.

Нами сконструированы иммуносорбентные диагностикумы, представляющие собой активированную вторичным алкилсульфатом натрия матрицу, состоящую из алюмосиликата и аурамина. Лигандом служили иммуноглобулины, выделенные из агглютинирующих иммунных туберкулёзных адсорбированных сывороток. В результате получены иммобилизованные системы, которым присущи положительные свойства неорганических матриц: гидрофильность, жесткость остова, химическая и микробиологическая устойчивость, отсутствие набухаемости в растворах, значительная адсорбционная емкость, отсутствие токсичности. Нами изучены закономерности иммобилизации антител и условия, при которых они проявляют иммунологическую активность в суспензиях.

Технология приготовления диагностикума состояла в следующем: к 100 мг алюмосиликата добавляли 50 мг аурамина и готовили 2 % суспензию в 0,1 М фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ), pH  $(7,2 \pm 0,2)$ . Далее проводили активирование матрицы, добавляя 0,1 мл вторичного алкилсульфата натрия, инкубировали 30, 60, 120, 240 мин при температуре 24 °С, 37 °С, 50 °С. Для иммобилизации использовали иммуноглобулины туберкулёзные в концентрации от 1 до 10 мг/мл, в объёме 5 мл, которые инкубировали от 2 до 18 часов, отмывали от несвязавшихся антител и красителя 0,1 М ФСБ, pH  $(7,2 \pm 0,2)$ , центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Осадок растворяли в 0,9 % растворе натрия хлорида с 1 % бычьего сывороточного альбумина до 1 % взвеси диагностикума и добавляли формалин до 1 %. Количественное соотношение красителя и алюмосиликата (1:2) оптимально. При исследовании влияния pH буферного раствора во время иммобилизации, установлено, что при увеличении кислотности снижается процент связывания сенситина. Увеличение pH реакционного раствора до 10 приводит к ложноположительной агглютинации. В результате подбора параметров установлено, что для оптимальной иммобилизации достаточной является концентрация белка 1,5 мг/мл, время иммобилизации - 2 час при температуре  $(26 \pm 4)$  °С, pH при сенсibili-

зации матрицы и постановки РСА - 7,0. Зависимость чувствительности препарата от времени и pH представлена на рис.11.

Постановку реакции суспензионной агглютинации (РСА) осуществляли на стекле. В качестве положительного контроля использовали взвесь туберкулёзного микроба в концентрациях:  $5 \times 10^7$ ;  $2,5 \times 10^7$ ;  $1,25 \times 10^7$ ;  $6,25 \times 10^6$ ;  $3,125 \times 10^6$ ;  $1,56 \times 10^6$ ;  $7,8 \times 10^5$ ;  $3,9 \times 10^5$  м.к./мл. В качестве отрицательного контроля использовали 0,9 % раствор натрия хлорида.



**Рисунок 11. Влияние температурного, временного факторов и pH на чувствительность суспензионного диагностикума при его изготовлении**

На предметное стекло с отрицательным контролем наносили 2 капли (0,05 мл) 0,9 % раствора натрия хлорида, pH ( $6,8 \pm 0,2$ ) и 1 каплю (0,025 мл) диагностикума суспензионного туберкулёзного иммуноглобулинового. На предметные стёкла с положительным контролем наносили по 2 капли микробной взвеси и по 1 капле соответствующего диагностикума. Капли тщательно перемешивали и при лёгком покачивании предметного стекла наблюдали в течение 1-5 мин в косопадающем свете за изменением структуры суспензии. В отрицательном контроле агглютинация отсутствовала (рис. 12а), в то время как на стёклах со взвесями туберкулёзного микроба наблюдалось полное просветление жидкости с крупнозернистыми хлопьями, т.е. чёткая агглютинация (рис. 12б). Чувствительность суспензионных диагностикумов

составила  $7,8 \times 10^5$  -  $1,56 \times 10^6$  м.к./мл по корпускулярным антигенам, при отсутствии агглютинации с гетерологичными штаммами.

Лиофилизация препаратов осуществлена на лиофильной установке LZ-9С в течение 18 часов, вакууме 10 Па, конечной температуре продукта  $25^\circ\text{C}$ . В результате установлено, что препарат стабилен в течение 1 года (срок наблюдения) без потери специфической активности.

Разработанная биотехнология получения туберкулёзного алюмосиликатного диагностикума обеспечивает получение сорбентов заданного состава, строения и эффективное выявление возбудителя туберкулёза.



а

б

**Рисунок 12. Реакция суспензионной агглютинации на стекле (а – отрицательная, без контакта с антигеном; б – резко положительная, с взвесью туберкулёзного микроба)**

Испытано 5 серий туберкулёзного диагностикума в 5 повторностях. Диагностикумы проверены в РСА на стекле с гомо- и гетерологичными штаммами (таблица 9). При проведении статистической обработки по методу Е.П. Тамбовцева с соавт.(1969), в серии опытов титр РСА  $\bar{t}$  равен  $0,92 \times 10^6$  м.к./мл (+7,2 %; -6,7 %).

Чувствительность разработанных диагностикумов соответствует чувствительности диагностикумов латексных иммуноглобулиновых в реакции агглютинации латекса (РАЛ). При этом учет результатов РСА на стекле возможен через 1-3 мин, а окончательный результат РАЛ через 16 - 18 ч.

**Таблица 9. Результаты сравнительной характеристики чувствительности диагностикумов туберкулёзных латексного и алюмосиликатного**

Штаммы микро- организмов	Реакции			
	Чувствительность РАЛ, м.к./мл		Чувствительность РСА, м.к./мл	
	Серия-1	Серия-2	Серия-1	Серия-2
1	2	3	4	5
<i>M. tuberculosis hu- manus H 37 RA</i>	$3,9 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$
<i>BCG</i>	$3,9 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$
<i>M. intracellulare, M. kansasii Yoss</i>	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й
<i>Nocardia brasiliensis</i>	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й
<i>B.abortus 544, 19- BA, 345; B. meliten- sis 16M, 565, Rev-1, B. suis 1330, 508, 6</i>	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й
<i>Salmonella typhi 818, 4446</i>	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й
<i>Streptococcus faecalis</i>	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й
<i>Staphylococcus epi- dermidis, aureus ACCT 25923</i>	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й
<i>Listeria monocyto- genes 1 -7cepomun</i>	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й	О т р и ц а- т е л ь н ы й

Таким образом, преимущество алюмосиликатного туберкулёзного диагностикума заключается в простоте постановки РСА и быстроте получения результатов.

## **ГЛАВА 6. Конструирование магнитоуправляемых иммуносорбентов для экспресс-диагностики микобактерий туберкулёза**

### **6.1. Разработка метода селективного концентрирования возбудителя туберкулёза на магноиммуносорбенте с последующей постановкой иммуноферментного анализа.**

Основное требование, предъявляемое к современным методам экспресс-анализа - выявление низких концентраций патогенного агента в максимально короткие сроки с высокой специфичностью. В последнее время актуальным является разработка и применение магносорбентов, благодаря которым упрощаются, ускоряются все этапы исследований при высокой чувствительности препаратов и возможности автоматизации учёта реакций.

Чувствительность и специфичность ИФА обусловлена не только степенью чистоты и активности используемых ингредиентов, но и свойствами твёрдой фазы, которая должна сохранять иммунологические свойства и стабильность, обладать минимальной активностью неспецифически связывать компоненты анализируемой системы и быть удобной при разделении фаз.

Целью наших исследований было конструирование тест-системы диагностической магноиммуносорбентной (МИС) туберкулёзной для иммуноферментного анализа (ИФА)

В работе использовали изготовленные нами (глава 4) иммунопероксидазные конъюгаты туберкулёзные с активностью 1:400-1:800, аффинные туберкулёзные магноиммуносорбенты, полученные по способу И.В. Жарниковой с соавт. (1999), оптимизируя параметры, применительно к данной инфекции.

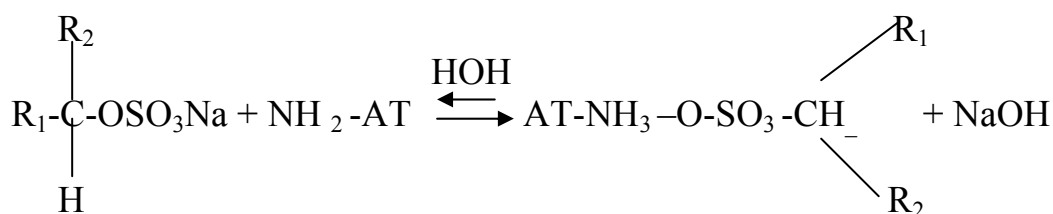
Нами разработана биотехнология приготовления органокремнезёмного магносорбента на основе окиси железа (III) и алюмосиликата. Модифицирование поверхности осуществляли в присутствии полимера - декстрана и поверхностно-активного вещества - вторичного алкилсульфата натрия.

На основе проведенных исследований рекомендованы следующие оптимальные условия получения алюмосиликатных магносорбентов: весовое соот-

ношение компонентов синтеза окиси железа, декстрана, алюмосиликата 2:2:1; время гелеобразования 2 часа (при увеличении времени удлиняется процесс синтеза магносорбента, уменьшается размер его пор, что приводит к снижению степени иммобилизации лиганда в порах сорбента), значение pH гелеобразования -7,0.

При возрастании количества окиси железа в композиционной смеси происходит увеличение размера радиуса пор сорбента и уменьшение удельной поверхности МС. Декстран оказывает стабилизирующий эффект за счёт образования вокруг частиц геля сольватных оболочек в связи с возникновением комплексов между электронодонорными атомами кислорода молекул органического вещества и силанольными группами кремнеземных корпускул. Алюмосиликат – пористый кремнезёмный носитель обладает активной поверхностью в отношении белков, проявляя механическую, микробиологическую и химическую устойчивость.

Далее проводили иммобилизацию специфических туберкулёзных иммуноглобулинов на МС (данные препараты без потери специфической активности хранятся в течение 3 лет (срок наблюдения). В качестве «сшивающего» агента нами использовано поверхностно-активное вещество (ПАВ)-вторичный алкилсульфат натрия, при этом прочность связи антител с магносорбентом повышается за счёт создания дополнительных связей, которые образуются между активными группами белка, полиглюкина (декстрана) и вторичного алкилсульфата натрия (рис.13).



**Рисунок 13. Схема получения МИС с помощью вторичного алкилсульфата натрия**

Для иммобилизации использовали различную концентрацию белка иммуноглобулинов (0,5-10 мг/мл). Исследования показали, что концентрация белка иммуноглобулинов 2,0 мг/мл является оптимальной для полного насыщения антителами сорбента в объеме 0,4 мл 10 % взвеси. При увеличении концентрации белка адсорбционная емкость МИС снижалась. Вероятно, это объясняется факторами стерического характера.

Оптимальными факторами, способствующими получению МИС, являются: время иммобилизации 2 часа при значении pH раствора иммуноглобулинов (6,0 - 7,0) и температуры в интервалах  $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$  и  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Методы получения МИС просты и технологичны, исключают применение токсичных веществ, изготовлены из отечественных экологически чистых компонентов. Полученные МИС характеризуются стандартностью структурных характеристик, механической, химической и микробиологической устойчивостью.

Сконструированные МИС были использованы при экспресс-диагностике возбудителя туберкулёза.

Эксперименты проводили с чистыми культурами туберкулёзного микроба. Из культур микобактерий готовили взвеси с концентрациями от  $1 \times 10^1$  до  $1 \times 10^9$  м.к. в 1 мл. Во флаконы вносили по 1 мл взвеси соответствующей концентрации микобактерий и по 0,2 мл 10 % суспензии туберкулёзного магноиммуносорбента, инкубировали в течение 30 – 60 мин при комнатной температуре, затем тщательно отмывали забуференным физиологическим раствором, вносили по 200 мкл рабочего разведения пероксидазного конъюгата и инкубировали при температуре  $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$  или  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 15, 30 и 60 мин. Промывали 0,1 М фосфатно – солевым буфером с твин-20 не менее 6 раз, используя постоянный магнит, поднося его к стенке флакона, в результате чего МИС оказывались фиксированными магнитным полем. После чего во флаконы вносили по 200 мкл хромогенной смеси. Через 1 – 2 мин (когда надосадочная жидкость слегка желтела в отрицательном контроле) содержимое флаконов переносили в

микропланшеты и останавливали реакцию 50 мкл стоп-реагента (2М раствором серной кислоты). Для учета результатов производили измерение оптической плотности на приборе "Мультискан" при длине волны 492 нм. Ответ считали положительным при превышении оптической плотности опытного раствора над контрольным (без контакта с антигеном) в 2 и более раза.

Аналогично проводили иммуноферментный анализ и в модельных опытах на нестерильной воде в объеме 500 мл, контаминированной различными концентрациями туберкулёзных микобактерий. Суспензии пропускали через устройство, удерживающее МИС магнитным полем. МИС после контакта с пробой тщательно промывали, снимали с ловушки, помещали во флакон и проводили ИФА по вышеописанному методу. Отрицательным контролем служили МИС, не контактировавшие с антигеном.

В обоих опытах получены положительные результаты при наличии в объеме пробы (1 мл и 500 мл)  $0,5 \times 10^2$ - $1 \times 10^2$  м.к. и выше.

Результаты проведенных исследований показали, что чувствительность ИФА одинакова при исследуемых температурных режимах -  $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$  и  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Другим важным параметром являлся временной режим. Установлено, что равновесный процесс между антигеном и МИС наступал через 30 мин, а между образовавшимся комплексом сорбент- антитело - антиген с конъюгатом - через 15 мин. Важным являлось количество отмывок после контакта с конъюгатом, так как при отмывке меньше 6 раз ухудшалась специфичность реакции, т.е. наблюдались фоновые значения оптической плотности в отрицательном контроле.

Для сравнения полученного диагностикума с традиционным методом постановки ИФА использовали полистироловые планшеты, сенсibilизированные туберкулёзными иммуноглобулинами в течение 18 ч, после чего проводили анализ в соответствии с методикой M.Clark и A. Adams (1977) в "сэндвич"-варианте ИФА. Чувствительность ИФА в данном случае составила  $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  м.к./мл. При этом время постановки ИФА с применением МИС составило 1-1,5

ч, а традиционным методом, учитывая 18 часовую сенсibilизацию планшет, около 20 ч. Если объём исследуемой пробы при использовании стандартных планшет не превышает 0,2 мл, то при применении МИС он неограничен (в нашем случае он равнялся 500 мл).

Результаты контроля специфической активности и специфичности туберкулёзного МИС представлены в таблице 10. Для контроля специфичности использовали штаммы культур гетерологичных микроорганизмов, из которых готовили взвеси с концентрацией от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^2$  м. к. в пробе.

Разработанная диагностическая система отличалась высокой специфичностью, не давая положительных результатов с гетерологичными микроорганизмами (таблица 10).

**Таблица 10. Результаты контроля специфической активности и специфичности туберкулёзного МИС в ИФА в сравнении с традиционным методом ИФА**

Вид микроорганизма	МИС в ИФА					Традиционный метод ИФА				
	Концентрация м.к. в пробе									
	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>
	Показатель оптической плотности: опыт/отрицательный контроль									
<i>M. tuberculosis humanus</i> H 37 RA	5,9	4,9	4,8	4,9	4,8	4,1	2,4	1,5	1,1	0,1
<i>BCG</i>	4,6	4,5	4,4	4,3	4,2	2,3	2,2	1,4	1,0	0,07
<i>M. intracellulare</i>	1,0	0,2	0,16	0,15	0,1	1,2	1,1	1,0	0,9	0,7
<i>Nocardia brasiliensis</i>	0,7	0,3	0,25	0,12	0,1	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7
<i>B.abortus</i> 544, 19-BA, 345	0,5	0,21	0,16	0,12	0,09	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9
<i>B. melitensis</i> 16M, 565, Rev-1	0,7	0,32	0,24	0,11	0,1	1,2	1,1	1,0	0,9	0,9
<i>B. suis</i> 1330, 508, 6	0,7	0,3	0,25	0,12	0,1	1,1	1,1	0,9	0,8	0,8
<i>Listeria monocytogenes</i> 1 -7cepomun	0,5	0,21	0,16	0,12	0,09	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9

При использовании стандартного иммуноферментного метода имеются следующие недостатки, которые отсутствуют в предложенной тест-системе в связи с использованием магнитоуправляемого магносorbента с включёнными

антителами: 1) для исследования берётся ограниченный 0,2 мл объём исследуемого материала (т.к. объём лунки – 0,4 мл), в то время как при использовании магноиммуносорбента объём неограничен; 2) время постановки иммуноферментного анализа около 20 часов, включая 18-ти часовую сенсibilизацию, а время проведения анализа с магноиммуносорбентами – 1-1,5 ч, 3) чувствительность иммуноферментного метода  $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  м.к./мл по корпускулярному антигену, а чувствительность представленной тест-системы составляет  $1 \times 10^2$  м.к./мл.

Таким образом, при использовании МИС в ИФА отпадала необходимость в полистироловых планшетах, становилось возможным проведение анализа проб неограниченного объёма, сокращалось время сенсibilизации твёрдой фазы в 15 раз, значительно увеличивался срок её хранения. Время проведения непосредственно анализа сокращалось в 1,5 раза, а чувствительность повышалась на несколько порядков по сравнению с общепринятым ИФА.

Нами проведены исследования по определению активности иммуноглобулиновых МИС жидких в ИФА в процессе их хранения. При закладке опыта активность МИС составляла 100 м.к. в пробе, опыт превышал отрицательный контроль (без контакта с антигеном) в 3 и более раз. Через 12 месяцев после проведения повторного контроля диагностикумов были получены аналогичные результаты. Такие исследования проводили каждый год в течение 3 лет (срок наблюдения). Препараты сохраняли свои физико-химические свойства и специфическую активность в течение всего срока наблюдения и оставались механически прочными, химически стабильными, устойчивыми к действию микроорганизмов (таблица 11).

При проведении статистической обработки по методу Е.П. Тамбовцева с соавт. (1969), в серии опытов титр ИФА  $\bar{t}$  равен  $0,8 \times 10^2$  м.к./мл (+8,7 %; -8,0 %).

Нами приготовлено 5 серий тест – систем магноиммуносорбентных для диагностики возбудителя туберкулёза в иммуноферментном анализе (ИФА), в

**Таблица 11. Показатели качества туберкулёзных МИС в зависимости от срока хранения**

Номер серии и наименование препарата	Дата контроля	Показатели качества			
		Прозрачность при стоянии	Цветность при взбалтывании	Специфическая активность	
				Штаммы микроорганизмов	Чувствительность в ИФА, м.к. в пробе
1	3	4	5	6	7
С-1  МИС туберкулёзные	2002 2003 2004 2005	Бесцветная прозрачная надосадочная жидкость, осадок чёрного цвета	Взвесь чёрного цвета с магнитными включениями, без признаков конгломерации	<i>M. tuberculosis humanus H 37 RA</i>  <i>BCG</i>	0,5-1x10 <sup>2</sup>

которые входят: туберкулёзные магноиммуносорбенты -10 % взвесь, 3 ампулы по 2 мл; положительный контроль - обеззараженные клетки микобактерий туберкулёза  $1 \times 10^9$  м.к./мл, 1 ампула -1 мл; иммунопероксидазный конъюгат с активностью 1:400-1:800 и все ингредиенты, необходимые для постановки ИФА (ФСБ, БСА, твин –20, цитратный буфер, хромоген, гидроперит, стоп-реагент).

Кроме стандартного метода ИФА, нами разработан и модифицированный способ его постановки, обеспечивающий упрощение, сокращение времени анализа при высокой чувствительности метода.

Сущность модификации при постановке анализа заключалась в том, что в качестве твёрдой фазы используются магносорбенты с иммобилизованными антителами (эту операцию можно провести заранее и хранить данные препараты без потери специфической активности в течение 3 лет (срок наблюдения). Постановку ИФА осуществляют в наконечниках от дозаторов, шприцах или маленьких колонках, внося туда 2 мл 10 % взвеси аффинных МИС. В дальнейшем через МИС пропускают исследуемый материал, а через сорбент с отрицательным контролем - фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) с твин-20. За 2 – 5 мин через МИС, взаимодействуя с антителом, прикреплённым к магносорбенту, проходит антиген, находящийся в исследуемом материале, формируя комплекс

антитело-антиген (АТ-Аг). МИС промывают 1 мл ФСБ-твин и вносят 0,2 мл рабочего разведения туберкулёзного иммунопероксидазного конъюгата, который, проходя через МИС, взаимодействует с комплексом АТ-Аг. Далее колонку промывают 5 мл ФСБ-твин. Для визуализации реакции через сорбент пропускают 0,2 мл субстрат-индикаторного раствора и учитывают результаты через 1-2 мин на сканирующем приборе «Мультискан» при 492 нм, добавив в окрашенный раствор стоп-реагент. Ответ считают положительным, если оптическая плотность опытного раствора превосходит оптическую плотность контрольного в 2 и более раза. В результате проведённых опытов было установлено, что показания оптической плотности опытных образцов превышали показания отрицательного контроля более чем в 5 раз, что говорит о положительном результате реакции. Данный метод позволяет обнаружить микобактерии в пределах  $1 \times 10^2$  -  $1 \times 10^3$  м.к. в пробе, при отсутствии перекрёстных реакций с гетерологичными штаммами, что свидетельствует о специфичности метода.

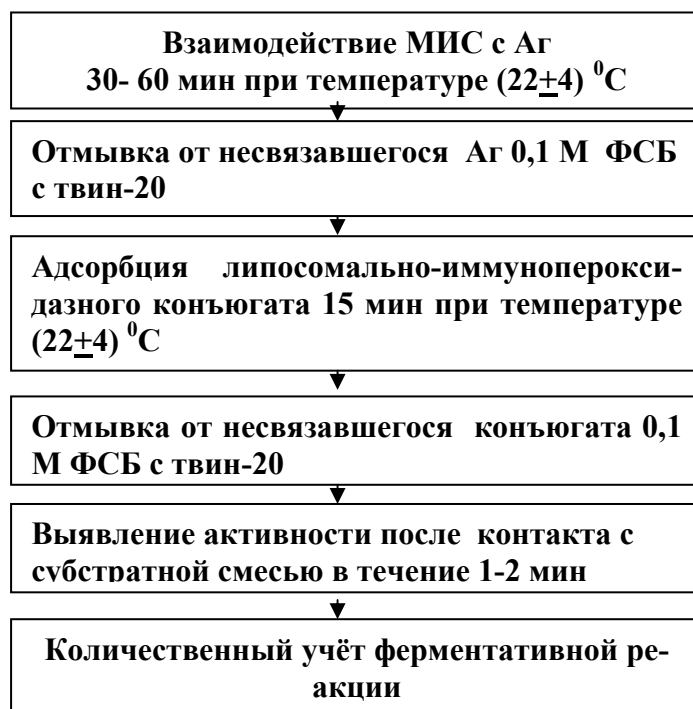
Таким образом, при использовании МИС в модифицированном ИФА отпадает необходимость в полистироловых планшетах. Пористая структура магносорбента оптимальна для образования иммунохимического комплекса антиген-антитело, исключает внутридиффузионное торможение при проведении анализа.

Высокую чувствительность ИФА с применением МИС можно объяснить тем, что для такого фермента как пероксидаза, используемого при изготовлении иммуноферментного конъюгата, металл, входящий в структуру МИС, повышает каталитическую функцию энзима (Берёзов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1982).

В качестве иммунопероксидазного конъюгата для выявления МТБ использовали также его липосомальную форму, получение и свойства которой описано в главе 4. Данный препарат применен при постановке ИФА с МИС. Схема постановки анализа представлена на рис. 14.

После контакта МИС с антигеном во флаконы вносили по 0,2 мл туберкулёзного липосомально-иммунопероксидазного конъюгата в его рабочем разведе-

дении, инкубировали при температуре  $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$  в течение 15-20 мин и промывали 5-6 раз 0,1 М ФСБ с твин-20. Во все флаконы вносили хромогенную смесь. Через 1-2 мин надосадочную жидкость из флаконов дозатором переносили в планшет по 0,10-0,15 мл и останавливали реакцию, внося по 0,05 мл раствора серной кислоты в концентрации 4 моль/л. Визуально регистрацию результатов оценивали по изменению интенсивности окраски смеси от оранжево-желтого цвета (опытные) до слабо желтого (контрольные). При инструментальном учете на фотометре оптическую плотность хромогенной смеси измеряли при длине волны 492 нм.



**Рисунок 14. Схема постановки ИФА с использованием МИС и липосомально-иммунопериоксидазного конъюгата**

Чувствительность препарата при выявлении МТБ была не ниже  $1 \times 10^2$  м.к. в пробе, при отсутствии перекрёстных реакций с гетерологичными штаммами бактерий. Для увеличения срока годности препарат разливали в ампулы, замораживали и лиофилизировали в течение  $(18 \pm 2)$  ч до конечной температуры  $25 ^\circ\text{C}$ . В готовом препарате контролировали физико-химические свойства (раство-

римось, цветность, прозрачность, потерю в массе при высушивании), а также иммунологическую активность, специфичность, чувствительность после лиофилизации и в процессе хранения в течение 3 лет (срок наблюдения). Данные представлены в таблице 12.

**Таблица 12. Результаты наблюдения за липосомально-иммунопероксидазным конъюгатом после лиофилизации в процессе хранения**

Серия препарата	Потеря в массе при высушивании	Срок наблюдения					
		1 год		1,5 года		3 года (срок наблюдения)	
		Растворимость и внешний вид	Чувствительность в ИФА с МИС	Растворимость и внешний вид	Чувствительность в ИФА с МИС	Растворимость и внешний вид	Чувствительность в ИФА с МИС
1	2,6	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^2$	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^2$	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^2$
2	2,6	1 мин Раствор белого цвета	$5 \times 10^1$	1 мин Раствор белого цвета	$5 \times 10^1$	1 мин Раствор белого цвета	$5 \times 10^1$
3	2,5	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^2$	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^2$	1 мин Раствор белого цвета	$1 \times 10^2$

Учитывая, что липосомальный туберкулёзный иммуноферментный диагностикум при использовании в качестве твёрдой фазы МИС позволял в ИФА обнаруживать МТБ в гораздо меньшем количестве, чем при постановке традиционной реакции в полистироловых микропланшетах, т.е. обладал большей чувствительностью, нами было получено 5 серий этих диагностических тест-систем. В полученный набор входят: лиофильно высушенный липосомально-иммунопероксидазный конъюгат, 0,1 мл в ампуле; взвесь туберкулёзного микроба  $10^9$  м.к./мл (положительный контроль); туберкулёзный МИС (10 % взвесь)- 2 ампулы по 2 мл, необходимые ингредиенты для постановки ИФА (ФСБ, БСА, твин-20, стоп-реагент- по 1 флакону, 0-фенилендиамин-2 флакона и таблетка гидроперита).

Таким образом, нами разработана биотехнология изготовления магноиммуносорбентных диагностикумов и на их основе сконструированы диагностические тест – системы для проведения сочетанного метода детекции микроорганизмов в иммуноферментном анализе, подобраны условия постановки ИФА с МИС. Установлено, что туберкулёзные магноиммуносорбенты в жидком виде стабильны без потери физико-химических и иммунологических свойств в течение 3 лет (срок наблюдения). ИФА с применением МИС характеризуется высокой чувствительностью ( $1 \times 10^2$  м.к. в пробе), специфичностью, быстротой постановки реакции (1-1,5 ч), стоимостью в 1,5 раза ниже традиционного ИФА (таблица 13). При этом отпадает необходимость применения сенсibilизированных микропланшет. При использовании разработанной липосомально-иммунопроксидазной тест-системы повышается срок годности препарата в 2 раза при сохранении его физико-химических и каталитических свойств.

**Таблица 13. Техничко-экономическое обоснование применения сочетанных методов МИС с ИФА**

Анализы		Количество анализов	Время постановки, ч	Статьи затрат					Стоимость 10 анализов, руб
				Заработная плата	Начисления на зар. плату (35,8%)	Сырьё и материалы	Оборудование	Накладные расходы (90%)	
ИФА	традиционный	10	3*	135,8	48,62	45,0	19,2	223,76	423,58
	сочетанный		1	78,6	28,14	42,0	19,2	151,15	319,09

**Примечание:** \* Время постановки традиционных анализов ИФА без учёта 18 часовой сенсibilизации планшет.

На основании сконструированных препаратов и проведённых исследований разработаны методические рекомендации «Применение магноиммуносорбентов для выявления микобактерий туберкулёза», одобренные Ученым Советом Ста НИПЧИ (протокол № 3 от 3.03.05) и утвержденные директором института. Со-

ставлены нормативные документы: регламент производства и инструкция по применению на тест-систему диагностическую липосомально- иммунопероксидазную для выявления антигена возбудителя туберкулёза иммуноферментным методом, рассмотренные на Учёном Совете СтавНИПЧИ (протокол № 3 от 3.03.05 г) и утвержденные директором института.

## **6.2. Разработка метода селективного концентрирования возбудителя туберкулёза на магноиммуносорбенте с последующей постановкой количественного иммунофлуоресцентного анализа**

В последние годы при выявлении МТБ широко применяют люминесцентную микроскопию. Этот метод значительно увеличивает диагностическую эффективность микроскопических исследований. Быстрота обнаружения МТБ, простота флюорохромирования делает его доступным для практических лабораторий. Преимущество метода люминесцентной микроскопии состоит в том, что она позволяет просматривать в короткий срок больше полей зрения, чем при обычной микроскопии с иммерсионной системой, при этом удаётся быстрее и в большем количестве выявлять МТБ. Люминесцентная микроскопия с применением аурамина позволяет увеличить процент находок на 8 % по сравнению с методом флотации и на 17 % по сравнению с прямой бактериоскопией мазка (Приказ МЗ РФ № 558, 1978). Метод бактериоскопии мазка с окраской люминесцентными красителями, в частности аурамином, основан на способности липидов микобактерий воспринимать люминесцентные красители и затем светиться при облучении их ультрафиолетовыми лучами. Этим методом можно исследовать любой материал, кроме мочи, в котором могут присутствовать трудно дифференцируемые при такой окраске сапрофиты (Приказ МЗ РФ № 558, 1978).

Другим важным преимуществом метода люминесцентной микроскопии является способность обнаруживать изменённые микобактерии, утратившие под влиянием ряда факторов, в частности интенсивной химиотерапии, свойство кислотоустойчивости и не выявляющиеся в связи с этим при окраске по методу Ци-

ля-Нильсена (Методические указания МЗ РФ «Микробиологические исследования при выявлении, диагностике и лечении туберкулёза», 2001).

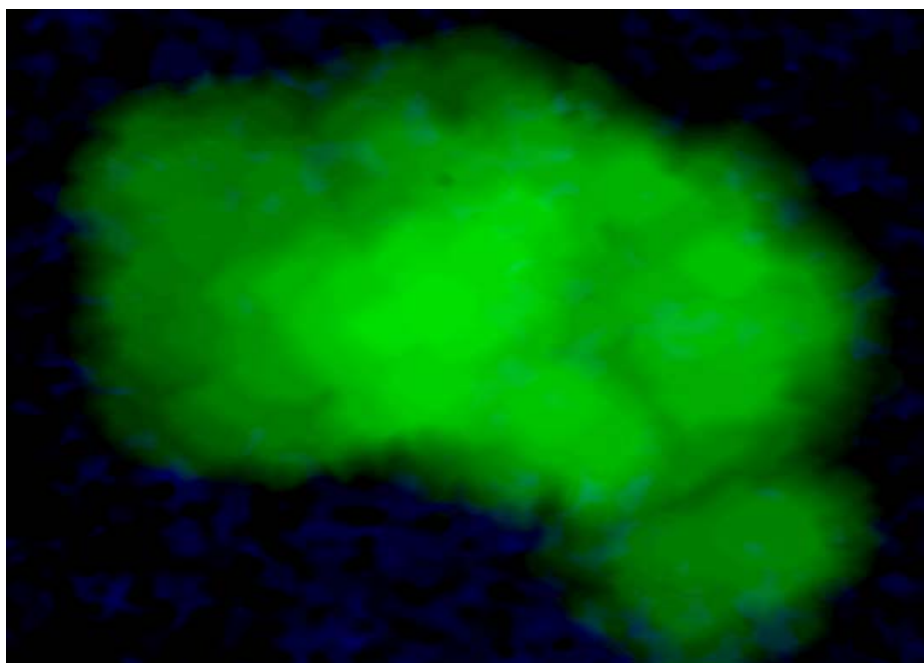
При окраске микобактерий аураминол возможны ложноположительные результаты в результате некачественного обесцвечивания мазка с сохранением некоторыми сапрофитными бактериями оранжевой окраски. Микроскопические исследования (окраска по Цилю-Нильсену и аураминол) не позволяют дифференцировать микобактерии комплекса *Mycobacterium tuberculosis* от нетуберкулёзных (атипичных микобактерий) микобактериозов. Используя эти методы, можно только сделать заключение о наличии или отсутствии кислотоустойчивых микобактерий (приказ МЗ РФ № 109. Приложение №11, 2003).

При внутривидовой дифференциации бактерий наиболее перспективными являются методы диагностики, основанные на образовании комплекса антиген-антитело, особенно в связи с возможностью использования в иммунофлуоресценции твёрдых носителей (Стоев К.Г. с соавт., 1981; Подзолкова Г.Г. с соавт., 1989 и т.д.).

Нами апробирован данный метод с применением магноиммуносорбентов для обнаружения антигенов возбудителя туберкулёза и определены оптимальные параметры постановки КИФА, чувствительность и специфичность метода.

Эксперименты проводили с чистыми культурами туберкулёзного микроба. Из культур готовили взвеси с концентрациями от  $1 \times 10^1$  до  $1 \times 10^9$  м.к/мл. Во флаконы вносили по 1 мл взвеси соответствующей концентрации микобактерий и по 0,2 мл 10 % суспензии туберкулёзного магноиммуносорбента. Смесь инкубировали в течение 15, 30, 60 мин при температурах  $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$  и  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , затем гранулы МИС отмывали 0,9 % раствором хлорида натрия pH 7,2, используя для сепарации постоянный магнит, удерживающий МИС на внутренней стенке флаконов. В дальнейшем к МИС добавляли 200 мкл раствора иммуноглобулинов G туберкулёзных флуоресцирующих (полученных нами при конъюгации иммуноглобулинов из адсорбированной туберкулёзной сыворотки путём фракционирования каприловой кислотой (Steibuch G., Andran R., 1969) с ФИТЦ ( $\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$ ) по методу

Х.Шторц (Stortz, 1987) и инкубировали 15, 30, 60 мин при  $(22\pm4)^\circ\text{C}$  и  $(37\pm1)^\circ\text{C}$ . Сорбент отмывали вышеуказанным способом 2-3 раза забуференным физиологическим раствором и 1 раз дистиллированной водой. Контролем служили гранулы МИС, не контактировавшие с исследуемым материалом и окрашенные флуоресцирующими иммуноглобулинами. Исследуемые опытные и контрольные взвеси в объеме 20 мкл наносили на предметное стекло и микроскопировали. Прибором, регистрирующим уровень свечения магнитных гранул, служил люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ Р-8, оборудованный фотометрической насадкой ФМЭЛ-14. К насадке подсоединяли источник тока УБПВ-1 и вольтметр цифровой универсальный В7-76. Рабочее напряжение составляло 800 – 900 В, увеличение объектива  $\times 40$  и окуляра  $\times 10$ . Применялись возбуждающие светофильтры БС-8-2, СЗС-7-2, ФС-1-6. Диаметр зонда фотометрической насадки составил 0,5 мм. После обнаружения в поле зрения гранул сорбента закрывали полевую диафрагму и снимали цифровые показания уровня свечения 10-15 гранул на вольтметре. Определяли среднеарифметические значения величины флуоресценции опытных (рис. 15), контрольных гранул и пространства между ними – фона.

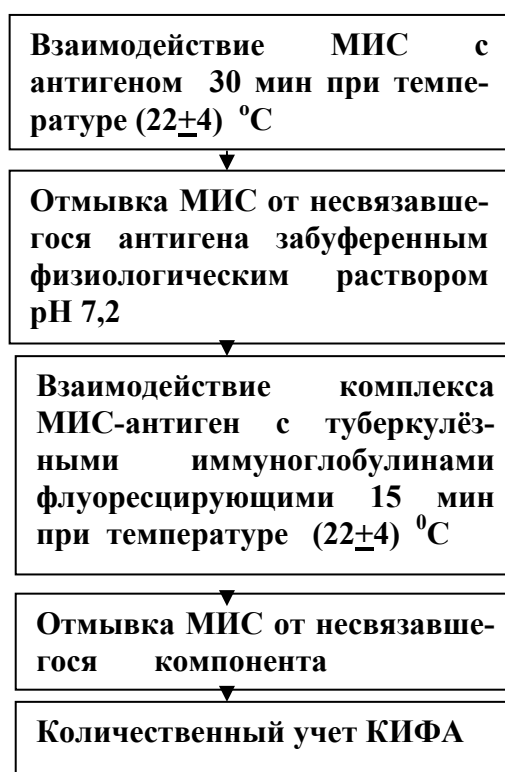


**Рисунок 15. Люминесцентная микроскопия магноиммуносорбента с фиксированными на нём МТБ. Увеличение  $\times 400$**

Интенсивность флуоресценции магноиммуносорбента (М) представляла собой разницу между среднеарифметическими показателями уровня свечения гранул и фона:  $(M) = M \text{ гранул} - M \text{ фона}$ . За положительные принимались результаты, при которых уровень флуоресценции опытных гранул в 2 и более раз превышал аналогичный показатель контрольных (Владимцева И.В. с соавт., 1989).

Для оценки способности туберкулёзных МИС концентрировать на своей поверхности специфический антиген приготавливали пробы водопроводной воды объёмом 500 мл, куда вносили МТБ в количестве  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  м.к. В дальнейшем эти пробы пропускали через МИС, находящиеся в специальной «ловушке» и удерживающиеся в ней магнитным полем.

Общая схема постановки КИФА представлена на рисунке 16.



**Рисунок 16. Схема постановки количественного иммунофлуоресцентного анализа с использованием в качестве твёрдой фазы МИС.**

МИС после контакта с пробой промывали 100 мл забуференного физиологического раствора pH 7,2, помещали во флакон и проводили КИФА по вы-

шеописанному методу. Контролем служили туберкулёзные МИС, неконтактировавшие с антигеном.

МТБ во всех случаях были выявлены при наличии в пробах  $1 \times 10^2$  м.к. и выше. Аналогично контролировали специфичность диагностической системы, используя гетерологичные штаммы (таблица 14). В результате установлено отсутствие перекрёстных реакций.

В процессе отработки различных условий проведения анализа установлено, что чувствительность КИФА была одинаковой при исследуемых температурных режимах сорбции антигена на МИС- ( $22 \pm 4$ ) °С и ( $37 \pm 1$ ) °С, а для контакта сорбента с антигеном и окрашивания образовавшегося комплекса флуоресцирующими иммуноглобулинами было достаточно 15-30 мин инкубации.

**Таблица 14. Результаты изучения специфической активности и специфичности туберкулёзных МИС в КИФА**

Штаммы	1 серия			2 серия			3 серия		
	Концентрация м.к. в пробе								
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
	Отношение уровня флюоресценции опытных гранул к контрольным								
<i>M. tuberculosis hu- manus H 37 RA</i>	4,5	4,0	1,7	3,6	3,9	1,5	3,9	4,1	1,2
<i>BCG</i>	3,8	4,3	1,5	4,3	4,1	1,7	3,6	3,7	1,9
<i>M. avium D4 ER</i>	4,7	4,3	1,6	4,8	4,3	1,5	4,7	4,2	1,9
<i>M. intracellulare</i>	0,9	0,6	0,6	0,7	0,7	0,6	0,9	0,6	0,8
<i>Nocardia brasiliensis</i>	0,6	0,9	0,7	0,6	0,9	0,9	0,8	0,9	0,7
<i>B.abortus 544, 19-BA, 345*</i>	0,7	0,8	0,7	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8
<i>B. melitensis 16M, 565, Rev-1*</i>	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,6	0,8
<i>B. suis 1330, 508, 6*</i>	0,8	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,7	0,9	0,7
<i>Listeria monocyto- genes 1 -7серотип*</i>	0,9	0,9	0,9	0,8	0,6	0,9	0,7	0,8	0,7
Отрицательный контроль	0,9	0,8	0,6	0,9	0,6	0,8	0,6	0,8	0,7

Примечание \*- представлены средние данные для возбудителей инфекций

Из таблицы следует, что отношение уровней флуоресценции опытных МИС в 2 раза выше по сравнению с контрольными, не контактирующими с ан-

тигеном, а также с сорбентами, обработанными гетерологичными штаммами. Данная диагностическая система позволяет выявлять возбудитель туберкулёза в концентрации  $0,5 \times 10^2$  -  $1 \times 10^2$  м.к./пробе.

При проведении статистической обработки по методу Е.П. Тамбовцева с соавт.(1969) в серии опытов чувствительность КИФА  $\bar{t}$  равна  $0,82 \times 10^2$  м.к./мл (+7,9 %; -7,3 %).

Нами приготовлено 5 серий тест – систем МИС для диагностики возбудителя туберкулёза в КИФА, в которые входят 3 ампл. по 2 мл. туберкулёзных МИС -10 % взвесь; положительный контроль - обеззараженные клетки микобактерий туберкулёза,  $1 \times 10^9$  м.к./мл, 1 ампула - 1 мл; иммуноглобулины туберкулёзные флуоресцирующие сухие – рабочее разведение 1:16 – 1:64 – 1 ампл.-0,5 мл.

При проведении технико-экономического обоснования применения сочетанных методов МИС с КИФА установлены явные преимущества данного метода перед традиционной иммунофлюоресцентной реакцией (таблица 15).

**Таблица 15. Техничко-экономическое обоснование применения сочетанных методов МИС с КИФА**

Анализы		Количество анализов	Время постановки, ч	Статьи затрат					Стоимость 10 анализов, руб
				Заработная плата	Начисления на зар. плату (35,8%)	Сырьё и материалы	Оборудование	Накладные расходы (90 %)	
РИФ	традиционный	10	2	109,2	39,09	28,1	21,3	177,92	375,61
КИФА	сочетанный		1	78,6	28,14	19,9	24,8	136,29	287,63

Таким образом, нами разработана биотехнология изготовления туберкулёзных МИС, на их основе сконструированы диагностические тест – системы для проведения сочетанного метода детекции возбудителя туберкулёза в КИФА и оптимизированы параметры постановки этой реакции. Данный метод обеспе-

чивает селективное концентрирование МТБ на сорбенте, обладает высокой чувствительностью ( $0,5 \times 10^2$  -  $1 \times 10^2$  м.к./в пробе), в 1000 раз превышающую чувствительность общепринятой РИФ, специфичностью и отличается быстротой постановки реакции (1-1,5 ч). При этом реакция учитывается не только визуально, но и инструментально в условных единицах по показаниям вольтметра.

## **ГЛАВА 7. Изучение диагностической ценности разработанных диагностикомов и тест-систем для выявления антигена возбудителя туберкулеза**

Для получения положительных результатов клинического применения разработанных диагностических препаратов и тест-систем при выявлении МТБ необходимо иметь чёткое представление о специфике выявляемого заболевания, его локализации в организме человека, о свойствах возбудителя микобактерий туберкулёза, методах подготовки исследуемых материалов, так как от совокупности знаний этих составляющих зависит качество диагностики.

Существует многообразие форм туберкулёзной инфекции, наиболее распространёнными являются: туберкулёз внутригрудных лимфатических узлов; диссеминированный; милиарный; кавернозный туберкулёз; туберкулёз медиастинальных лимфоузлов.

**Туберкулёз внутренних лимфатических узлов** - вариант первичного туберкулёза. Процесс у человека развивается на фоне нарушения иммунной системы. Поражаются прикорневые лимфатические узлы преимущественно средней доли правого лёгкого, язычкового сегмента, а также бронхопульмональные лимфатические узлы верхних долей лёгких. Патологоанатомическая характеристика процесса сходна с казеозным лимфаденитом в первичном туберкулёзном комплексе.

**Диссеминированный** туберкулёз характеризуется лимфогематогенным распространением инфекции, начинается с поражения лимфатического сосуда и завершается в стенке кровеносного сосуда. Данный вид туберкулёза отличается хроническим течением и развивается на базе скрытого течения инфекции. При данной форме очаги в лёгких имеют различную величину и возраст, часть из них прогрессирует, часть рубцуется или кальцинируется, что свидетельствует о длительном волнообразном течении процесса. Очаги инфекции отличаются кортикоплевральной локализацией, симметричностью поражений, продуктивной тканевой реакцией, могут быть мелкими, средними и крупными. Наблюда-

ется развитие сетчатого пневмосклероза, эмфиземы, лёгочного сердца. Нераспознанные и нелеченные формы диссеминированного туберкулёза через фазу инфильтративной вспышки с распадом могут трансформироваться в деструктивные формы туберкулёза.

**Кавернозный** туберкулёз характеризуется наличием изолированно сформированной каверны со слабо развитым фиброзным слоем и отсутствием в окружающей ткани выраженного склероза и очагов-отсевов. Его исходной формой может быть инфильтративный, очаговый, диссеминированный туберкулёз и туберкулёма. Каверна располагается обычно в более глубоких отделах лёгкого. Большое значение в прогрессировании каверны имеет состояние дренирующих бронхов, в стенках которых формируется казеозный эндомезо- и панбронхит. Больные данной формой туберкулёза могут умереть от лёгочного кровотечения или других осложнений.

**Фиброзно-кавернозный** туберкулёз лёгких является результатом прогрессирования большинства форм первичного или вторичного периодов болезни, характеризуясь формированием в органе одной или несколько каверн с широким фиброзным слоем на фоне распространённого очагового склероза и очагов-отсевов различного генеза. При длительном хроническом течении фиброзно-кавернозного туберкулёза возрастают процессы фиброзирования и очаговой эмфиземы лёгких.

**Туберкулёз медиастинальных лимфоузлов** - интоксикационный синдром в сочетании с кальцинацией лимфоузлов, продуктивным кашлем, выделением микобактерий. Основные методы диагностики в настоящее время - рентгенологический и бронхоскопический.

У больных с тяжёлым течением лёгочного туберкулёза первично нарушается функция соединительной ткани лёгкого, развивается мезенхимопатия, сопровождающаяся повышением проницаемости гистогематического барьера, поражением терминальных бронхиол.

В связи с этим, при туберкулёзе перспективны медико-биологические исследования соединительной ткани и микроциркуляторного русла лёгких в неблагоприятных условиях биосферы для жизни, при нейроэндокринных стрессах, иммуносупрессивном лечении и т.д. (Ерохин В.В. с соавт., 1996).

Данные, представленные Чутаевым Ю.П. с соавт. (1996) показывают, что положительная реакция на пробу Манту среди больных туберкулёзом лёгких составляет 67,7 %, кониотуберкулёзом – 52,4 %, силикотуберкулёзом – 38,7, неспецифическими заболеваниями органов дыхания (пневмония, хронический бронхит, абсцесс лёгкого) – 50 %, здоровых людей – 33,3 %. Как видно из представленных данных, проба Манту не в полной мере выявляет заболевание туберкулёзом при наличии ложноположительных результатов у здоровых людей.

Выявление антигенов возбудителя туберкулёза крайне затруднительно. Известны случаи, когда в группе больных фиброзно-кавернозным туберкулёзом только в фазе распада впервые выявлялся антиген (Хоменко А.Г., 1992). Для внелёгочного туберкулёза на фоне широчайшего полиморфизма бактерий характерны малая частота обнаружения возбудителя в патологическом материале и невозможность воспользоваться данными рентгенологической картины на ранних этапах заболевания. L. K. Surkova et.al. (2003) представлены исследования по изучению поражённых туберкулёзом очагов и установлено, что положительный ответ при исследовании секционного материала на МТБ был в 25 % случаев, при которых отмечался отрицательный результат изучения мокроты.

Длительный латентный период и поздняя манифестация симптомов вызывают трудности диагностики. Таким образом, контроль над туберкулезом среди населения требует хорошо организованных программ по скринингу и лечению (Miranda A.G., 2003).

Целью наших исследований являлось максимально возможное лабораторное выявление возбудителя МТБ у наиболее эпидемически опасной категории пациентов среди лиц, обратившихся в Краевой клинический противотуберку-

лѐзньй диспансер г.Ставрополя с подозрительным в отношении туберкулѐза клиническими или рентгенологическими симптомами. С этой целью были сконструированы принципиально новые тест-системы, которые позволяют значительно повысить эффективность выявления возбудителя туберкулѐза, по сравнению с существующими методами, что было подтверждено клиническими испытаниями.

Обследование людей проводили, оценивая следующие основные параметры, по которым больных подразделяли на группы:

- лица, имеющие соответствующую симптоматику со стороны органов дыхания (наличие в течение 3 нед. и более продуктивного кашля с выделениями слизистой, слизисто-гноной мокроты или мокроты с прожилками крови);
- лица, имеющие выявленные лучевыми методами изменения в лѐгких, подозрительные на туберкулѐз;
- лица из контакта с больными туберкулѐзом, выделяющие микобактерии и имеющие соответствующие симптомы заболевания;
- лица с подозрением на внелѐгочные формы туберкулѐза;

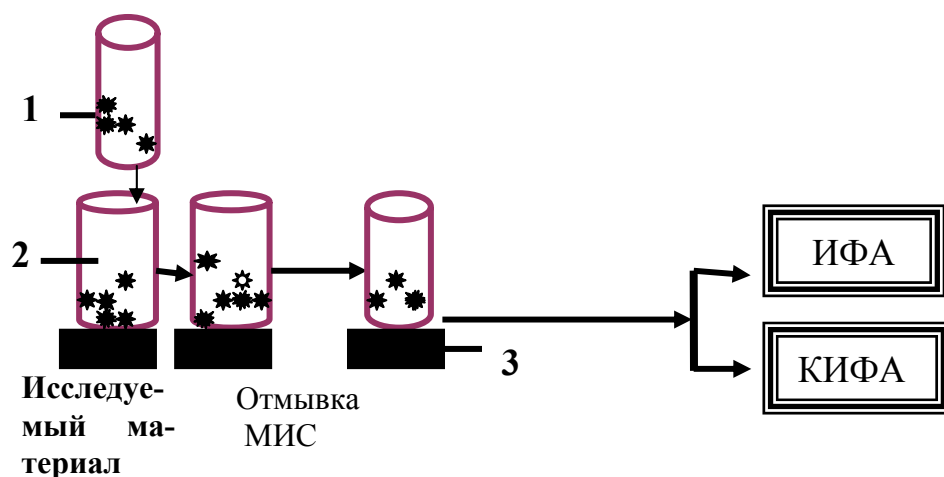
Особенно важны выделение и идентификация возбудителя при наблюдении за больными туберкулѐзом с неудовлетворительными результатами стандартного курса химиотерапии, у которых возбудителями заболевания могут быть лекарственно-устойчивые формы микобактерий или нетуберкулѐзные микобактерии (возбудители микобактериозов).

Изучив формы туберкулѐза, место локализации антигенов и истории болезни больных туберкулѐзом, мы подошли к решению задачи подготовки проб исследуемого материала.

Сбор, хранение, транспортировку и работу с диагностическим материалом (моча, мокрота) проводили согласно приказу МЗ РФ № 109, приложение № 10 от 21.03.2003. Постановку РАЛ, РСА, ИФА проводили аналогично описанному в соответствующих главах диссертации. Селективное концентрирование анти-

гена возбудителя туберкулёза на МИС с последующей постановкой экспресс-анализов (ИФА и КИФА) осуществляли в два этапа (рис. 17):

1 этап- селективное концентрирование. В каждый флакон с исследуемым материалом (мокрота, ресуспендированная в 10 кратном объёме забуференного физиологического раствора pH 7,2; моча, объёмом 1-10 мл) вносили по 0,5 мл 10% ресуспендированного МИС и инкубировали при комнатной температуре в течение 30-40 мин. Далее, удерживая МИС при помощи постоянного магнита на дне флакона, выливали жидкость, к осадку МИС добавляли 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ), перемешивали встряхиванием и переносили в бактериологическую пробирку или флакон. Таким образом промывали МИС 5-6 раз, удаляя отмывочный раствор, удерживая МИС при помощи магнита; 2 этап- исследование МИС в ИФА и КИФА (методика описана в главе 6).

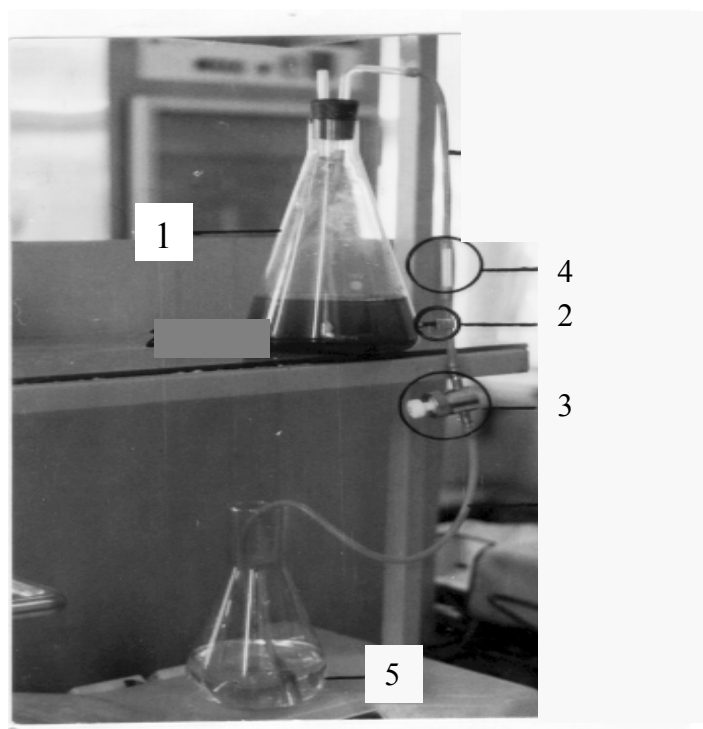


**Рисунок 3. Схема проведения экспресс-анализов при выявлении антигенов МТБ с применением МИС**

Обозначения: 1 – гранулы МИС туберкулёзные; 2- туберкулезный антиген; 3 – постоянный магнит.

Для обеспечения селективного концентрирования антигенов МТБ из проб больных большого объёма (мокрота, разведённая забуференным физиологическим раствором pH 7,2; моча) использовали туберкулёзные МИС, помещённые в проточную магнитную ловушку, через которую пропускали исследуемые

жидкости, регулируя скорость их протекания зажимом (рис.18). Меняя местами колбы, можно многократно пропускать через ловушку исследуемую пробу, достигая максимального концентрирования микобактерий и их антигенов на МИС. После этого систему промывали 100 мл забуференного физиологического раствора рН 7,2, тем самым обеспечивая отмывание МИС от посторонних примесей и несвязавшихся компонентов. В дальнейшем из ловушки извлекали МИС, на поверхности которого за счёт реакции антиген-антитело фиксировались микобактерии туберкулёза и его антигены, и помещали в колбу или пробирку для проведения исследований в ИФА и КИФА.



**Рис. 18. Исследование проб с использованием проточной магнитной ловушки с МИС**

*Обозначения:* 1 - колба с исследуемой пробой; 2 - зажим; 3 - проточная магнитная ловушка с МИС; 4 - соединительные трубки; 5 – колба для приема пробы.

Тестирование микобактерий осуществлено методами: РАЛ, РСА, ИФА, МИС с ИФА и КИФА.

Было исследовано 286 проб клинического материала (моча, мокрота) от больных различными формами туберкулёза из краевого клинического противотуберкулёзного диспансера, 12 проб материала от больных с нетуберкулёзными

заболеваниями и 11 проб от здоровых людей, у которых исследовали мочу и слюну (табл.16).

**Таблица 16. Результаты исследования клинического материала (моча, мокрота) на наличие в нём МТБ и его антигенов**

Клиническая форма	Кол-во проб	РСА	РАЛ	ИФА	МИС+ ИФА	МИС + КИФА
		Количество положительных результатов				
Диссеминированный ТБ лёгких (мокрота)	24	15	14	17	23	23
Фиброзно-кавернозный ТБ лёгких (мокрота)	25	18	18	20	25	24
Инфильтративный ТБ лёгких (мокрота)	33	18	17	18	23	22
Очаговый ТБ лёгких (мокрота)	48	35	34	39	45	47
Кавернозный ТБ почек (моча)	21	13	14	14	20	21
Туб.коксит (моча)	22	12	14	16	20	20
Туб.спондилит (моча)	21	14	15	18	20	20
Туб.иридоцикл. (моча)	24	17	18	21	22	21
Инфильтративный ТБ почек (моча)	26	15	16	20	23	23
ТБ муж. пол. органов (моча)	26	17	17	20	24	24
ТБ увеит (моча)	16	12	12	14	15	15
Неспецифические заболевания (онкология, пиелонефрит и т.д.)	12	2	1	1	1	1
Здоровые люди	11	-	-	-	-	-
Всего больных ТБ	286	186 (65 %)	189 (66 %)	217 (76 %)	260 (91 %)	260 (91 %)

Примечание. В скобках указано количество положительных проб на наличие специфических антигенов у больных туберкулёзом в процентах

Методики постановки этих реакций и система учёта положительных результатов приведены в главах 5 и 6.

Как видно из таблицы, используя комплекс разработанных препаратов и методов (РСА, РАЛ, ИФА, ИФА с МИС, КИФА с МИС), можно проводить качественную диагностику туберкулёза, обнаруживая у больных специфические

туберкулёзные антигены. Максимальный процент выявления этих антигенов при исследовании больных достигнут с помощью сочетанных методов, использующих МИС с ИФА и КИФА.

Анализ полученных данных позволил установить, что использование адсорбированной туберкулёзной сыворотки при конструировании диагностических препаратов даёт возможность диагностировать заболевание туберкулёзом у людей, дифференцируя его от другой патологии.

С помощью ИФА и КИФА, где в качестве твёрдой фазы используются МИС с иммобилизованными антителами против антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, показано, что антиген возбудителя туберкулёза выявляется в мокроте, моче туберкулёзных больных в 91 % случаев и не обнаруживается у здоровых людей.

Указанные методы превосходят по информативности РСА, РАЛ и традиционный ИФА, проводимый в полистироловых планшетах. Это связано с тем, что при использовании МИС с ИФА и КИФА специфический антигенный материал концентрируется на сорбенте из проб большого объёма.

Недостаточная чувствительность традиционного ИФА ( $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  м.к./мл), как отмечают некоторые исследователи, связана с нестандартностью адсорбционной поверхности планшет из полистирола, что приводит к непрочному связыванию АТ и их адсорбции на этапах иммуноферментного анализа.

Отсутствие 100 % специфичности разработанных диагностических систем объясняется тем, что, хотя при их изготовлении использована туберкулёзная сыворотка, адсорбированная гетерологичными антигенами на твёрдом носителе (это несомненно повысило специфичность анализа), однако полного удаления из неё гетерологичных иммуноглобулинов, вероятно, не произошло, так как, род микобактерий составляет более 100 видов (Методические рекомендации МЗ РФ, 1992), которые содержат общие антигены с большим количеством нетуберкулёзных микобактерий и других микроорганизмов, например, с *Nocardia*, *Brucella*, *Listeria* и т.д.

В настоящее время усложнилась также микробиологическая и серологическая диагностика туберкулёза из-за часто встречаемых атипичных микобактерий, изменившейся биологии возбудителя (морфология, ферментативная активность, биологические свойства) вследствие широкого применения разнообразных противотуберкулёзных препаратов.

Обобщая преимущества данных тест-систем, следует отметить, что разработанные новые диагностические средства для выявления возбудителя туберкулёза на основе МИС позволяют обнаруживать корпускулярные и растворимые антигены возбудителя при их низкой концентрации в материале (50-100 микробных клеток в пробе), проводить исследования с пробами большого объёма. Эти системы относятся к средствам экспресс-диагностики туберкулёза, т.к. позволяют получить результат через 1-1,5 ч после начала исследования. Немаловажным является и тот факт, что туберкулёзный МИС не теряет своих физико-химических и иммунологических свойств при хранении на протяжении 3 лет (срок наблюдения).

В табл. 17 представлены сравнительные данные методов диагностики туберкулёза, используемые в настоящее время в клинической практике и разработанные нами.

**Таблица 17. Сравнение методов диагностики туберкулёза**

№ п/п	Метод	Время детекции	Выявляемость	Литературный источник
1.	Туберкулинодиагностика	72 ч	67 %	Чутаев Ю.П. с соавт, 1996
2.	Культивирование МТБ	1-3 мес.	0,5-14 %	Клименко М.Т. с соавт, 1987
3.	Микроскопия (флуоресцентная с аураминол)	2,5 ч	14 %	Канюк А.Н., 1995
4.	РСА	5 мин	65 %	<b>Собственные данные</b>
5.	РАЛ	2 ч	66 %	
6.	ИФА	3 ч*	76 %	
7.	ИФА с МИС	1-1,5 ч	91 %	
8.	КИФА с МИС	1-1,5 ч	91 %	

\*- без учёта 18 часовой сенсibilизации планшет

Как видно из таблицы, наиболее эффективными методами для диагностики возбудителя туберкулёза являются ИФА и КИФА с МИС, которые отличаются

ся высокой чувствительностью, специфичностью и непродолжительным сроком проведения анализа. При этом обнаружение туберкулёзных антигенов возможно у больных с различной локализацией патологического процесса при взятии материала на исследование у них бесконтактным способом (моча, мокрота).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Каждую минуту в мире от туберкулёза умирают четыре человека. В России в 2004 г. зарегистрировано около 102,9 тыс. больных с установленным впервые активным туберкулёзом, а показатель по сравнению с 2003 г. увеличился на 3,3 %, достигнув 71,7 на 100 тыс. населения. Среди детей до 14 лет также выросла заболеваемость на 3,8 %. Больные туберкулёзом органов дыхания составляют 95,6 % из числа всех зарегистрированных случаев заболевания туберкулёзом (Ильин И.А., 2005). В связи с неблагоприятной обстановкой по туберкулёзу в Российской Федерации в последние годы (Онищенко Г.Г. 2003) и недостаточным качеством диагностических препаратов, основные направления медицинской биотехнологии предусматривают расширение возможностей диагностики микобактерий туберкулёза за счёт появления новых экспрессных высокоспецифичных, чувствительных, доступных методов и препаратов, что способствует оперативному эпидемиологическому анализу и формированию целенаправленных противоэпидемических и медицинских противотуберкулёзных мероприятий.

Увеличение заболеваемости туберкулёзом, вызванным МТБ и нетуберкулёзными микобактериями, повышает значимость их индикации и идентификации, что крайне важно для проведения подходящей антибактериальной терапии.

В настоящей работе представлены результаты научно-методических разработок биотехнологии медицинских иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики микобактерий туберкулёза.

Производство диагностических препаратов представляет собой единую биотехнологическую систему, которая складывается из последовательных стадий и операций, количество и особенности которых зависят от вида производимой продукции.

При получении качественных диагностических препаратов необходимо выделить из микробных биомасс высокоочищенные активные и специфические антигенные комплексы, применяемые при иммунизации животных и в качестве положительного контроля в тест-системах, подобрать схему иммунизации животных, получить специфические иммунные сыворотки, отработать параметры биотехнологии изготовления диагностических систем.

При всём многообразии способов извлечения специфических антигенов из микробных клеток необходимо было подобрать комплекс биотехнологических операций, который бы позволил изолировать в достаточном количестве для производственных целей полноценные в антигенном отношении фракции из МТБ. Для этого была использована водно-солевая экстракция МТБ и других бактерий. По данным ряда исследователей (Вейнблат В.И., 1971; Афанасьев Е.Н., 1986 и др.), такие экстракты обладают сложным макромолекулярным составом и в них обнаруживаются в тех или иных количествах большинство присутствующих у бактерий антигенов. Водорастворимые туберкулёзные антигены изолировали комплексным методом: водно-солевой экстракцией, ультразвуковой и механической дезинтеграцией, осаждением антигенов сульфатом аммония. Полученный препарат содержал не менее 20 мг/мл белка и формировал зоны преципитации в РИД с иммунной сывороткой в разведении 1:32 – 1:64.

Для получения туберкулёзных иммунных сывороток нами апробированы различные схемы иммунизации. При получении агглютинирующих сывороток, в которых в основном присутствуют иммуноглобулины класса М, использовали «короткую» схему иммунизации (Афанасьев Е.Н., 2000) с иммунокорректорами - тималином и циклофосфаном; при получении преципитирующих сывороток, в которых преобладают иммуноглобулины класса G, - применяли «длинную» схему (Тюменцева И.С., 1994) с иммунокорректором феракрилом. Использование иммунокорректоров позволило повысить эффективность иммунизации при незначительном расходе антигенного материала и существенном повышении титров специфических антител (до 1:600 в РНИФ и 1:64 в РИД).

В связи с тем, что антигенный спектр микобактерий туберкулёза имеет много общего с представителями родов *Nocardia*, *Brucella*, *Listeria* и некоторыми нетуберкулёзными микобактериями, идентификация МТБ и его дифференциация крайне важна для практического здравоохранения и проведения подходящей антибактериальной терапии. Для конструирования эффективных туберкулёзных диагностических препаратов необходимы высокоспецифические иммунные сыворотки, нуждающиеся в удалении из них перекрёстно реагирующих антител. Для этих целей наилучшим способом является использование аффинного сорбента, представляющего собой гетерологичные антигены, ковалентно закреплённые на твёрдой матрице. Очистка иммунной сыворотки происходит за счёт биоспецифического взаимодействия между антигенами, закреплёнными на матрице, и антителами, подлежащими удалению.

Результаты предыдущих исследователей и наш собственный опыт показали, что сорбция корпускулярными антигенами существенно понижает специфические титры антител и делает непригодным сырьё для дальнейшего использования из-за появления в нём экстрагируемого из бактериальных клеток материала, применение же для этих целей полиакриламидных сорбентов базируется на применении высокотоксичных импортных реактивов и довольно трудоёмка. В связи с этим, мы впервые для данных целей использовали разработанный аффинный сорбент с магнитными свойствами, где в качестве твердой фазы выступает кремнезем-алюмосиликат. МС готовили при соотношении компонентов ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , декстран, алюмосиликат) - 2:2:1 соответственно; время гелеобразования - 2 ч, значение рН гелеобразования - 7,0.

Активирование сорбента производили методом окисления, используя перхлорат натрия. Для придания магносорбенту аффинных свойств на его поверхность иммобилизовали лиганды - водорастворимые антигены (2,5 мл с концентрацией белка 2 мг/мл), полученные из гетерогенных штаммов микроорганизмов (*Brucella abortus* 19, *Nocardia brasiliensis*, *M. intracellulare* # 23, *M. kansasii* Yoss), дающих перекрёстные реакции с иммунными сыворотками. Оп-

тимальными факторами, способствующими получению МИС, являются: время иммобилизации антигенов на МС – 2 ч при значении рН 6 - 7 и температура 24 - 37 °С.

Методы получения иммуносорбентов просты и технологичны, исключая применение токсичных веществ. Полученные МИС характеризуются стандартностью структурных характеристик, механической, химической и микробиологической устойчивостью, не подвержены набуханию. Использование отечественных экологически чистых компонентов, их дешевизна, простота технологии изготовления свидетельствуют о достоинствах алюмосиликатных МИС.

При сорбции туберкулёзной иммунной сыворотки данный антигенный МС, взаимодействуя с соответствующими иммуноглобулинами, освобождал сыворотку от неспецифических антител на одном этапе, сохраняя первоначальную специфическую активность нативных иммунных сывороток. Магнитные свойства иммуносорбента позволяли значительно упростить процесс отделения его от жидкой фазы в магнитном поле и исключить процесс длительного центрифугирования.

Проведённые исследования дают основание утверждать, что применение алюмосиликатных антигенных МИС позволяет проводить качественную иммуносорбцию, сохраняя активность и специфичность иммунных сывороток. При этом не происходит попадания в сыворотку антигенного материала, в ней отсутствуют комплексы «антиген-антитело», появляющиеся в материале при сорбции корпускулярными антигенами и мешающие в дальнейшем созданию специфических диагностических систем, титры специфических антител не снижаются и конечный продукт является качественным сырьем для дальнейшей работы. Данный сорбент можно регенерировать и многократно использовать.

Из сорбированной туберкулёзной сыворотки иммуноглобулины выделяли с помощью каприловой кислоты по методу G. Steibuch, R. Andran (1969).

Варьируя количеством используемых компонентов, pH растворов, температурой и временем проведения реакций, выделенные туберкулёзные иммуноглобулины конъюгировали с ферментом пероксидазой, липосомами, латексом, алюмосиликатом, органокремнезёмной матрицей, содержащей оксид железа, получая соответственно иммунопероксидазный конъюгат для ИФА, диагностикумы для РАЛ, РСА и МИС.

Для ковалентного связывания пероксидазы с туберкулёзными иммуноглобулинами использовали метод перйодатного окисления углеводной части фермента (Р.К.Nakane, А.Кawaoi, 1974). Сформировавшиеся при этом альдегидные группы образовывали ковалентную связь с аминогруппами антител. Очистку конъюгата от непрореагирующих компонентов осуществляли на колонке с сефадексом G-100, после чего его лиофилизировали. Полученный препарат был стабилен без потери активности в течение 1 г. Рабочий титр полученных иммунопероксидазных туберкулёзных конъюгатов составил 1:400-1:800.

В иммуноферментной реакции, в которой в качестве твёрдой фазы применяли стандартные планшеты, чувствительность конъюгата по водорастворимым антигенам составила 50-100 мкг/мл, по возбудителю туберкулёза – ( $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  м.к./мл). С гетерологичными штаммами диагностикум не взаимодействовал, что говорит о его специфичности.

В результате проведённой сорбции сыворотки крови от гетерологичных антител и чётко отработанных параметров конъюгации лиганда и маркёра получены высокоэффективные (1:600), специфичные (отсутствуют перекрёстные реакции с гетерологичными штаммами) иммуноферментные конъюгаты.

На основе полученных препаратов была сконструирована тест-система для экспресс-диагностики возбудителя туберкулёза, состоящая из 1 ампулы иммуноферментного конъюгата, 1 ампулы положительного контроля (обеззараженная взвесь туберкулёзного микроба)-  $1 \times 10^9$  м.к./мл, 1 ампулы иммуноглобулинов туберкулёзных и необходимых ингредиентов для постановки ИФА (ФСБ,

твин-20, БСА, стоп-реагента - 4 М раствора серной кислоты, хромогена - орто-фенидендиамина, таблетки гидроперита). Одной ампулы с препаратом в объеме 0,1 мл, с активностью-1:600 достаточно для исследования 300 проб в ИФА.

Ферменты с лабильной структурой молекулы даже в охлаждённом состоянии при 4 °С имеют ограниченный срок хранения, который удаётся увеличить при придании им определённой жёсткости в процессе иммобилизации энзимов на твёрдофазные носители.

В качестве такого носителя использовали липосомы, которые получали из фосфолипидов и ганглиозидов, выделенных из мозга к.р.с., а в последнее время из мозга свиней, не являющегося потенциально опасным при губчатой энцефалопатии животных (коровье бешенство). Разработанная биотехнология выделения сырья для приготовления липосом (ТУ 9154-00-01897080-2004) включала измельчение и обезвоживание мозга животных ацетоном, экстрагирование из него фосфолипидов и ганглиозидов смесью хлороформ-этанол (1:1) и дробное осаждение указанных липидсодержащих фракций ацетоном. Данные способы выделения фосфолипидов и ганглиозидов защищены патентами РФ № 2192265 от 10.10.2002 и № 2195296 от 27.12.2002.

Методом тонкослойной хроматографии в препарате фосфолипидов обнаружены в основном фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфотидилинозит, а также холестерин.

Полученные препараты растворяли в хлороформе в конечной концентрации 50 мг/мл и смешивали фосфолипиды и ганглиозиды в соотношении 20:1, добавляя туда антиоксидант – 0,5 %  $\alpha$ -токоферол. Этот липидный раствор использовали для приготовления липосом методом «выпаривания в обращённой фазе» в соответствии с методическими рекомендациями «Иммобилизация в липосомы веществ различной химической природы. Стерилизация и стабилизация липосом», утвержденными Главным Государственным санитарным врачом

России Г.Г. Онищенко. 06.04.2000 г. В результате получены липосомы, идентифицированные при электронной микроскопии, размером 150-300 нм.

При получении липосомального иммуноферментного диагностикума предварительно активировали ( $5 \pm 0,1$ ) мг пероксидазы хрена по методике, описанной выше. В результате в углеводной части молекулы пероксидазы формировались альдегидные группы, обеспечивающие фиксацию фермента к мембране липосом за счёт аминокрупп ганглиозидов и последующую за этим иммобилизацию туберкулёзных иммуноглобулинов на сформированном комплексе с участием оставшихся свободных альдегидных групп фермента.

С этой целью к 5 мг окисленной пероксидазы добавляли 1 мл суспензии липосом в 0,01 М КББ pH 9,5, содержащей 18 мг липидов, смесь подвергали кратковременной ультразвуковой обработке. После удаления несвязавшейся на липосомах пероксидазы путём хроматографии на колонке с сефадексом G-100, уравновешенной 0,01 М КББ pH 9,5, к препарату добавляли туберкулёзные иммуноглобулины G в оптимальном количестве (5 мг/мл). Смесь инкубировали 2 ч при температуре ( $22 \pm 4$ ) °C и несвязавшиеся иммуноглобулины отделяли от липосомального конъюгата хроматографически на колонке с сефадексом G-100, уравновешенной 0,1 М ФСБ pH ( $7,2 \pm 0,1$ ).

В лиофилизированном состоянии туберкулёзный липосомальный иммуноферментный препарат по чувствительности и специфичности не отличался от туберкулёзного иммуноферментного конъюгата и сохранял все свои свойства в течение 2 лет (срок наблюдения), в 2 раза превышая срок хранения туберкулёзного иммуноферментного диагностикума.

Нами осуществлена разработка биотехнологии изготовления латексных (полиакролеиновых) диагностикумов для выявления возбудителя туберкулёза. Латексы выбраны в качестве носителей, так как их химические свойства относительно постоянны и поддаются точной характеристике. Наличие альдегидных групп на их поверхности позволяет легко образовывать ковалентную связь с аминокруппами белков. Таким образом, проанализировав литературные дан-

ные и проводя экспериментальные исследования, направленные на повышение технологичности производства латексных диагностикумов, нами были отработаны оптимальные условия их изготовления. Для сенсibilизации использовали иммуноглобулины класса М из адсорбированных туберкулёзных сывороток при их оптимальной нагрузке -400 мкг/мл (при увеличении количества иммобилизованного лиганда отсутствовал отрицательный контроль, а при уменьшении – снижалась чувствительность диагностикума). Время сенсibilизации составляло 6 ч при температуре - 50 °С и рН среды – (7,2±0,1). При уменьшении времени сенсibilизации, температуры и рН среды до 5 снижалась чувствительность препарата, при увеличении рН до 9,0 - отсутствовал отрицательный контроль.

Чувствительность разработанных диагностикумов в РАЛ с возбудителем туберкулёза составила  $3,9 \times 10^5$ - $7,8 \times 10^5$  м.к./мл при отсутствии перекрёстных реакций с гетерологичными штаммами.

С целью получения диагностикума, обнаруживающего возбудитель туберкулёза в течение нескольких минут, была использована алюмосиликатная кремнезёмная матрица с пористой структурой, обладающая высокой сорбционной активностью. Твёрдофазный краситель окрашивали аурамином в весовом соотношении 2:1 и активировали вторичным алкилсульфатом натрия. Были подобраны оптимальные параметры биотехнологии подготовки твёрдофазного носителя и иммобилизации на него туберкулёзных иммуноглобулинов класса М, выделенных из адсорбированной сыворотки. Оптимальными параметрами при этом были следующие: концентрация белка иммуноглобулинов -1,5 мг/мл, время иммобилизации - 2 ч при температуре (26±4) °С.

При исследовании влияния кислотности буферного раствора во время сенсibilизации, установлено, что при увеличении кислотности снижается процент связывания сенситина. Увеличение рН реакционного раствора до 10 приводит к ложноположительной агглютинации. Оптимальный рН при сенсibilизации матрицы и постановки РСА - 7,0.

Данный диагностикум в РСА на стекле, взаимодействуя с туберкулёзным антигеном, формировал крупнозернистые хлопья с просветлением жидкости. С гетерологичными штаммами бактерий агглютинации диагностикума не наблюдалось.

Чувствительность сконструированных диагностикумов суспензионных иммуноглобулиновых туберкулёзных в РСА на стекле составила  $7,8 \times 10^5$  -  $1,56 \times 10^6$  м.к./мл, что соответствует чувствительности диагностикумов латексных иммуноглобулиновых в реакции агглютинации латекса (РАЛ). При этом предварительный учет РСА на стекле возможен через 1-3 мин, а окончательный результат РАЛ (макрометод)- 16- 18 ч. Таким образом, преимущество этого метода заключается в простоте постановки реакции и скорости получения результатов.

Основные требования, предъявляемые к современным методам экспресс-анализа, заключаются в выявлении низких концентраций патогенного агента в максимально короткие сроки с высокой специфичностью. В последнее время для этих целей нашли применение магноиммуносорбенты, благодаря которым упрощаются, ускоряются все этапы исследований при высокой чувствительности диагностических препаратов и наличии возможности автоматизации учёта реакций.

Цель наших исследований – конструирование тест-системы диагностической магноиммуносорбентной туберкулёзной для иммуноферментного анализа.

Чувствительность и специфичность ИФА обусловлена не только степенью чистоты и активности используемых ингредиентов, но и свойствами твёрдой фазы, которая должна сохранять иммунологические свойства и стабильность в иммобилизованном состоянии, обладать минимальной неспецифической адсорбцией и быть удобной при разделении фаз.

Нами разработана биотехнология изготовления органокремнезёмного магносорбента на основе алюмосиликата и окиси железа (III). Модифицирова-

ние его поверхности осуществляли в присутствии полимера - декстрана и поверхностно-активного вещества - вторичного алкилсульфата натрия.

На основе проведенных исследований рекомендованы следующие оптимальные условия получения алюмосиликатных магносорбентов: весовые соотношения компонентов синтеза окиси железа, декстрана, алюмосиликата 2:2:1, время гелеобразования 2 ч (при увеличении времени удлиняется процесс синтеза магносорбента, уменьшается размер его пор, что приводит к снижению степени иммобилизации лиганда в порах сорбента), значение pH гелеобразования - 7,0.

Далее проводили иммобилизацию специфических туберкулёзных иммуноглобулинов G на МС (данные препараты без потери специфической активности хранятся в течение 3 лет (срок наблюдения). В качестве сшивающего агента нами использовано поверхностно-активное вещество - вторичный алкилсульфат натрия, при этом прочность связи антител с магносорбентом повышается за счёт создания дополнительных связей, которые образуются между активными группами белка, полиглюкина (декстрана) и вторичного алкилсульфата натрия.

Исследования показали, что концентрация белка иммуноглобулинов 2,5 мг/мл является оптимальной для полного насыщения антителами сорбента в объеме 0,4 мл 10 % взвеси. При увеличении концентрации белка адсорбционная емкость МИС снижалась.

Оптимальными факторами, способствующими получению МИС, являются: время иммобилизации 2 часа при значении pH раствора иммуноглобулинов 6-7 и температуры  $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$  и  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Методы получения МИС просты и технологичны, исключают применение токсичных веществ, диагностикумы изготовлены из отечественных экологически чистых компонентов. Полученные МИС характеризуются стандартностью структурных характеристик, механической, химической, микробиологи-

ческой устойчивостью и сохраняют специфическую активность в течение 3 лет (срок наблюдения).

МИС сохраняли способность концентрировать на своей поверхности бактериальные клетки возбудителя туберкулёза, которые затем выявляли с помощью ИФА.

В опытах на чистых культурах возбудителя туберкулёза получены положительные результаты при наличии в объеме пробы  $0,5 \times 10^2$  -  $1 \times 10^2$  м.к. и выше. При этом данное количество микробных тел могло присутствовать в 1 или 500 мл исследуемых проб. Если объём этих проб был большим (500 мл), то данную пробу пропускали через МИС, удерживаемый в специальной ловушке магнитным полем, что обеспечивало концентрацию МТБ на МИС. В дальнейшем сорбент обрабатывали туберкулёзным иммуноферментным конъюгатом, отмывали от несвязавшихся компонентов реакции, вносили субстрат-индикаторный раствор, по изменению цвета которого проводили учёт реакции.

Результаты проведённых исследований показали, что чувствительность ИФА одинакова при исследуемых температурных режимах -  $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$  и  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Другим важным параметром являлся временной режим. Установлено, что равновесный процесс между туберкулёзным антигеном и МИС наступал через 30 мин, а между образовавшимся комплексом и конъюгатом - через 15 мин. Важным являлось количество отмывок МИС после контакта с конъюгатом. При отмывке МИС меньше 6 раз ухудшалась специфичность реакции, т.е. наблюдались фоновые значения оптической плотности в отрицательном контроле.

Разработанная диагностическая система отличалась высокой специфичностью, не давая положительных реакций с гетерологичными микроорганизмами с концентрацией  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^6$  м.к. в исследуемой пробе.

Для сравнения полученного диагностикума с традиционным методом постановки ИФА использовали полистироловые планшеты, сенсibilизированные туберкулёзными иммуноглобулинами в течение 18 ч, далее проводили анализ в

соответствии с традиционной методикой. Чувствительность ИФА в данном случае составила  $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  м.к./мл. При этом время постановки ИФА с применением МИС - 1-1,5 ч, а традиционным методом, учитывая 18 ч сенсibilизацию планшет, около 20 ч. Если объём исследуемых проб при использовании стандартных плашек не превышает 0,2 мл, то при использовании МИС он не ограничен.

В качестве иммунопероксидазного конъюгата для выявления МТБ использовали также его липосомальную форму. Данный диагностикум обнаруживал фиксированные на МИС за счёт специфической реакции «антиген-антитело» МТБ в количестве  $1 \times 10^2$  м.к. в пробе при отсутствии реакций с гетерологичными штаммами бактерий.

Таким образом, при использовании МИС в ИФА отпадала необходимость в полистироловых планшетах, сокращалось время сенсibilизации твёрдой фазы в 15 раз, значительно увеличивался срок хранения сенсibilизированной твёрдой фазы; время проведения непосредственно анализа сокращалось в 1,5 раза, а чувствительность повышалась на несколько порядков по сравнению с общепринятым ИФА.

Учитывая, что липосомальный туберкулёзный иммуноферментный диагностикум при использовании в качестве твёрдой фазы МИС позволял в ИФА обнаруживать МТБ в гораздо меньшем количестве, чем при постановке традиционной реакции в полистироловых микропланшетах, т.е. обладал большей чувствительностью, нами было получено 5 серий этих диагностических систем. В полученный набор входят: лиофильно высушенный липосомально-иммунопероксидазный конъюгат-0,1мл -1 ампула; обеззараженная взвесь туберкулёзного микроба  $1 \times 10^9$  (положительный контроль)- 0,5 мл-1 ампула; туберкулёзный МИС (10 % взвесь)-по 2мл-2 ампулы и все необходимые ингредиенты для постановки ИФА (ФСБ, БСА, твин-20, стоп-реагент –по 1 флакону, хромоген-ортофенилендиамин-2 флакона и таблетка гидроперита).

Таким образом, нами разработана технология изготовления туберкулёзных магноиммуносорбентных диагностикумов и на их основе сконструированы диагностические тест – системы для проведения сочетанного метода детекции микроорганизмов в иммуноферментном анализе, подобраны условия постановки ИФА с МИС. Установлено, что туберкулёзные магноиммуносорбенты в жидком виде стабильны без потери физико-химических и иммунологических свойств в течение 3 лет (срок наблюдения). ИФА с применением МИС обладает высокой чувствительностью ( $1 \times 10^2$  м.к. в пробе), быстротой постановки реакции (1-1,5 ч), что подтверждено многочисленными испытаниями. При этом отпадает необходимость использования сенсibilизированных микропланшет. При использовании разработанной липосомально-иммунопероксидазной тест-системы повышается срок годности препарата в 2 раза.

На основе полученных экспериментальных данных разработаны методические рекомендации «Применение магноиммуносорбентов для выявления микобактерий туберкулёза», одобренные Ученым Советом СтавНИПЧИ (протокол № 3 от 3.03.05) и утвержденные директором института. Составлены нормативные документы: регламент производства и инструкция по применению на тест-систему диагностическую липосомально- иммунопероксидазную для выявления антигена возбудителя туберкулёза иммуноферментным методом, рассмотренные на Учёном Совете СтавНИПЧИ (протокол № 3 от 3.03.05 г) и утвержденные директором института.

В последние годы при выявлении микобактерий туберкулёза широко применяют люминесцентную микроскопию. Этот метод значительно увеличивает диагностическую эффективность микроскопических исследований. Быстрота обнаружения микобактерий, простота флуорохромирования делает его доступным для практических лабораторий. Люминесцентная микроскопия с применением аурамина позволяет увеличить процент находок на 8 % по сравнению с методом флотации и на 17 % по сравнению с прямой бактериоскопией мазка (Приказ МЗ РФ № 558, 1978). Метод бактериоскопии мазка с окраской люми-

несцентными красителями, в частности аурамином, основан на способности липидов микобактерий воспринимать люминесцентные красители и затем светиться при облучении их ультрафиолетовыми лучами. Этим методом можно исследовать любой материал, кроме мочи, в котором могут быть трудно дифференцируемые при такой окраске сапрофиты (Приказ МЗ РФ № 558, 1978).

Другим важным преимуществом метода люминесцентной микроскопии является способность обнаруживать изменённые микобактерии, утратившие под влиянием ряда факторов, в частности интенсивной химиотерапии, свойство кислотоустойчивости и невыевляющиеся в связи с этим при окраске по методу Циля-Нильсена (Методические указания МЗ РФ «Микробиологические исследования при выявлении, диагностике и лечении туберкулёза», 2001).

При окраске микобактерий аурамином возможны ложноположительные результаты в процессе некачественного обесцвечивания мазка, что может привести к сохранению некоторыми сапрофитными бактериями оранжевого цвета. Микроскопические исследования (окраска по Цилю-Нильсену и аурамином) не позволяют дифференцировать микобактерии комплекса *Mycobacterium tuberculosis* от нетуберкулёзных (атипичных микобактерий) микобактериозов. На основе этих методов можно только сделать заключение о наличии или отсутствии кислотоустойчивых микобактерий (приказ МЗ РФ № 109. Приложение №11, 2003).

Наиболее перспективными являются методы диагностики, основанные на образовании комплекса антиген-антитело, особенно в связи с возможностью использования в иммунофлуоресценции твёрдых носителей (Стоев К.Г. с соавт., 1981; Подзолкова Г.Г. с соавт., 1989 и т.д.). С этой целью из адсорбированной туберкулёзной сыворотки путём фракционирования каприловой кислотой были выделены иммуноглобулины, которые метили флуоресцирующим маркером (ФИТЦ) по общепринятой методике. Они использованы в сочетании с магноиммуносорбентами для обнаружения антигенов возбудителя туберкулёза, были определены также оптимальные параметры постановки количествен-

ного иммунофлуоресцентного анализа (КИФА), чувствительность и специфичность метода.

В опытах на чистых культурах и в модельных опытах на воде, контаминированной различными концентрациями туберкулёзных микроорганизмов, получены положительные результаты при наличии в объеме пробы  $1 \times 10^2$  м.к. и выше, при отсутствии перекрёстных реакций с гетерологичными штаммами. Прибором, регистрирующим уровень свечения магнитных гранул, служил люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ Р-8, оборудованный фотометрической насадкой типа ФМЭЛ-14. К насадке подсоединяли источник тока УБПВ-1 и вольтметр цифровой универсальный типа В7-76.

В процессе отработки различных условий проведения анализа установлено, что чувствительность КИФА была одинаковой при исследуемых температурных режимах сорбции антигена на МИС-  $(22 \pm 4) ^\circ\text{C}$  и  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , а для контакта сорбента с антигеном и окрашивания образовавшегося комплекса антиген-антитело флуоресцирующими иммуноглобулинами было достаточно 15-30 мин инкубации.

Нами приготовлено 5 серий тест – систем МИС для диагностики возбудителя туберкулёза в КИФА, в которые входят 3 ампулы по 2 мл туберкулёзных МИС-10 % взвесь; положительный контроль - обеззараженные клетки микобактерий туберкулёза,  $1 \times 10^9$  м.к./мл, 1 ампула -1 мл; иммуноглобулины туберкулёзные флуоресцирующие сухие – рабочее разведение 1:16 – 1:64 – 1 амп – 0,5 мл.

Таким образом, нами разработана биотехнология изготовления магно-иммуносорбентных диагностикумов и на их основе сконструированы диагностические тест – системы для проведения сочетанного метода детекции возбудителя туберкулёза в количественном иммунофлуоресцентном анализе, оптимизированы параметры постановки КИФА. Данный метод позволяет осуществлять селективное концентрирование МТБ на сорбенте, обладает, высокой чувствительностью ( $0,5 \times 10^2$  -  $1 \times 10^2$  м.к./пробе), значительно превышающую чувст-

вительность общепринятой РИФ, возможностью быстро, в течение 1-1,5 ч учитывать реакцию не только визуально, но и инструментально (в условных единицах по показаниям вольтметра).

Разработанные диагностические препараты и тест-системы для выявления микобактерий туберкулёза испытаны не только в лабораторных условиях, но и в условиях клиники. Для получения положительных результатов клинических испытаний диагностических препаратов необходимо иметь чёткое представление о специфике выявляемого заболевания, его локализации в организме человека, о свойствах возбудителя микобактерий туберкулёза, методах подготовки исследуемых материалов, так как от совокупности знаний этих составляющих зависит качество диагностики.

Выявление антигенов возбудителя туберкулёза крайне затруднительно. Известны случаи, когда в группе больных фиброзно-кавернозным туберкулёзом только в фазе распада впервые выявлялся антиген (Хоменко А.Г., 1992). Для внелёгочного туберкулёза на фоне широчайшего полиморфизма бактерий характерны малая частота обнаружения возбудителя в патологическом материале и невозможность воспользоваться данными рентгенологической картины на ранних этапах заболевания.

Целью наших исследований являлось максимально возможное выявление антигенов МТБ у наиболее эпидемически опасной категории пациентов, обратившихся в Краевой клинический противотуберкулёзный диспансер г. Ставрополя с подозрительными в отношении туберкулёза клиническими или рентгенологическими симптомами.

Сбор, хранение, транспортировку и работу с диагностическим материалом (моча, мокрота) проводили согласно приказу МЗ РФ № 109, приложение № 10 от 21.03.2003.

Проведено тестирование микобактерий и их антигенов в материале от больных разными методами: РАЛ, РСА, ИФА, МИС с ИФА и КИФА.

Было исследовано 11 проб от здоровых людей (контроль) и 286 проб клинического материала (моча, мокрота) от больных из краевого клинического противотуберкулёзного диспансера, у которых диагноз туберкулёз (диссеминированный ТБ лёгких, фиброзно-кавернозный ТБ, очаговый ТБ, ТБ мужских половых органов и т.д.) дифференцировался с неспецифическими заболеваниями (онкологическими, пневмонией, хроническим бронхитом, и т.д. - всего 12 человек). При постановке РСА, РАЛ, ИФА (традиционным методом на плашках) выявляемость туберкулёзных антигенов в моче и мокроте больных составила 65 %, 66%; 76 % соответственно, при постановке ИФА и КИФА с МИС - 91 %. Все разработанные диагностикумы дали отрицательный результат при исследовании мочи и мокроты здоровых людей.

Таким образом, используя комплекс разработанных препаратов и методов (РСА, РАЛ, ИФА, ИФА с МИС, КИФА с МИС), можно проводить качественную диагностику туберкулёза. Максимальный процент выявления микобактерий туберкулёза при исследовании больных был получен с помощью сочетанных методов ИФА и КИФА с МИС.

При сравнении результатов иммуноферментных анализов традиционного с использованием полистироловых плашек и сочетанного с применением МИС установлено, что результаты исследований значительно различаются. За счёт селективного концентрирования на своей поверхности туберкулёзных антигенов, присутствующих в моче и мокроте больных, возможности концентрирования этих антигенов из проб большого объёма и более высокой чувствительности МИС с ИФА и КИФА обнаруживал положительные результаты в 91% случаев, в отличие от традиционного ИФА, при использовании которого в этих же пробах туберкулезный антиген выявлялся в 76% случаях.

В таблице 18 приведены сравнительные данные по времени постановки реакции, сроках сохранности твердой фазы с иммобилизованными туберкулёзными иммуноглобулинами, чувствительности традиционного ИФА и сочетанного использования ИФА и КИФА с МИС.

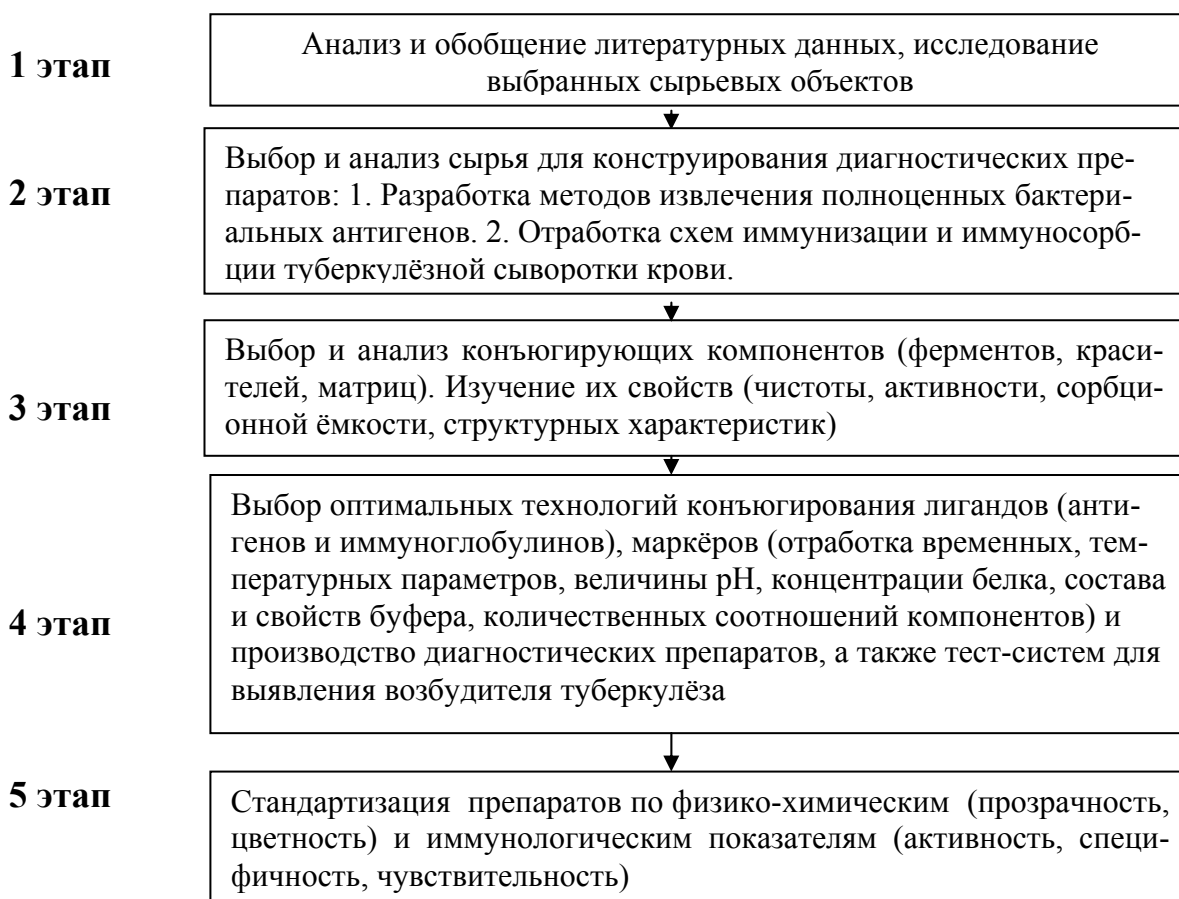
**Таблица 18. Сравнительная характеристика традиционных и сочетанных экспресс-анализов**

Традиционные экспресс-анализы					Экспресс-анализы с МИС (сочетанные)				
Анали- зы	Вре- мя пос- та- нов- ки, ч	Срок год- ности сен- си- бил. твёр- дой фазы	Исследуемые объекты		Анали- зы	Вре- мя пос- та- нов- ки, ч	Срок годно- сти сен- сibil. твёрдой фазы	Исследуемые объек- ты	
			Чис- тая куль- тура	За- грязнё нные объек- ты внеш- ней				Чистая куль- тура	Загряз- нённые объекты внешней среды
ИФА	21	20 дн.	5x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>5</sup>	ИФА	1	3 г (срок наблю- дения)	0,5x10 <sup>2</sup> - 1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>
РИФ	2	-	5x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>5</sup>	КИФА	1	3 г (срок наблю- дения)	0,5x10 <sup>2</sup> - 1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>

Обобщая преимущества данных тест-систем следует отметить, что нами получены принципиально новые диагностические препараты для выявления возбудителя туберкулёза, позволяющие обнаруживать с высокой чувствительностью ( $1 \times 10^2$  м.к. в пробе) антигены возбудителя при их низкой концентрации в материале, проводить исследования проб большого объёма, освободиться от неспецифических компонентов реакции за счёт тщательного промывания МИС, фиксированных в магнитном поле. Данные системы относятся к средствам экспресс-диагностики туберкулёза, т.к. позволяют получить результат через 1-1,5 ч после начала исследования. Немаловажным является и то, что туберкулёзный МИС не теряет своих физико-химических и иммунологических свойств (чувствительность и специфичность) при хранении на протяжении 3 лет (срок наблюдения).

Анализ полученных данных позволил установить, что использование адсорбированной туберкулёзной сыворотки при конструировании диагностических препаратов по разработанной биотехнологии даёт возможность получать различные специфические и чувствительные диагностикумы для выявления возбудителя туберкулёза в модельных объектах и у больных людей.

В итоге проведённых исследований подтверждены основные методологические подходы к разработке, изучению и производству различных иммунопрепаратов для диагностики возбудителя туберкулёза. Составлена блок-схема производства и исследования данных препаратов (рис. 19).



**Рисунок 19. Блок-схема производства и исследования туберкулёзных диагностических препаратов**

В процессе научно-методических разработок созданы новые латексные (для РАЛ), иммуноферментные (для ИФА) диагностикумы, сконструированы

новые препараты алюмосиликатные (суспензионные для РСА), липосомально-иммуноферментные (для ИФА), магноиммуносорбентные (для ИФА, КИФА), позволяющие выявлять возбудитель туберкулёза, его антигены в объектах внешней среды и в клиническом материале. Использование селективного концентрирования возбудителя на МИС с последующим проведением экспресс-анализа расширяет возможности индикации возбудителя туберкулёза за счёт высокой чувствительности ( $1 \times 10^2$  -  $5 \times 10^1$  м.к./в пробе, объём которой практически не ограничен), позволяет получать результаты анализа в короткие сроки (1-1,5 ч), даёт возможность проведения и завершения анализов без выделения культуры, при использовании только нативного материала, что способствует оперативному эпидемиологическому анализу и формированию целенаправленных противотуберкулёзных медицинских мероприятий.

## ВЫВОДЫ

1. Сочетанное использование водно-солевой экстракции, механической и ультразвуковой дезинтеграции позволило выделять из обеззараженных ацетоном микобактерий туберкулёза полноценные антигенные комплексы с серологической активностью 1:32-1:64 в реакции иммунодиффузии с туберкулёзной сывороткой. Данная биотехнология оказалась пригодной для изолирования антигенов из близкородственных возбудителю туберкулёза в серологическом отношении микроорганизмов.
2. При получении высокоактивных туберкулёзных иммунных сывороток для иммунизации кроликов применяли выделенные антигенные комплексы с иммуномодуляторами феракрилом, тималином и циклофосфаном. Специфическая активность полученных сывороток в непрямой реакции иммунофлуоресценции достигала 1:400 –1:600, а в реакции иммунодиффузии –1:32-1:64.
3. Удаление из туберкулёзных иммунных сывороток перекрёстно реагирующих антител с помощью магнитных сорбентов с ковалентно фиксированными на их поверхности антигенами гетерологичных штаммов обеспечило получение сырья, пригодного для конструирования различных диагностических препаратов.
4. Разработанная биотехнология изготовления липосомальных туберкулёзных иммунопероксидазных конъюгатов обеспечила получение высокочувствительного, специфического диагностикума, отличающегося повышенной стабильностью при хранении по сравнению с традиционным иммунопероксидажным конъюгатом.
5. Впервые осуществлена научная разработка биотехнологии производства серии высокоспецифических диагностических препаратов и иммобилизованных систем для выявления возбудителя туберкулёза и его антигенов

в искусственно контаминированных пробах и в клиническом материале от больных (моча, мокрота).

6. Чувствительность разработанного туберкулёзного латексного диагностикума в реакции агглютинации латекса (РАЛ) составила  $3,9 \times 10^5$  -  $7,8 \times 10^5$  м.к./мл, а алюмосиликатного туберкулёзного диагностикума в реакции суспензионной агглютинации (РСА) на стекле -  $7,8 \times 10^5$  -  $1,56 \times 10^6$  при учёте результатов РАЛ через 16-18 ч, а РСА – через 1-3 мин. В клиническом материале (моча, мокрота) у больных туберкулёзом специфические антигены микобактерий выявлены в РАЛ в 66 % случаев, в РСА - в 65 %.

7. Туберкулёзные магнитные иммуносорбенты, полученные по разработанной биотехнологии, способны селективно концентрировать на своей поверхности микобактерии туберкулёза, его антигены из исследуемых проб большого объёма, включая клинический материал от больных туберкулёзом, и выступать в качестве твёрдой фазы при осуществлении иммуноферментного и количественного иммунофлуоресцентного анализов, обеспечивающих с высокой специфичностью выявление туберкулёзного микроба в течение 1-1,5 ч с чувствительностью  $1 \times 10^2$  м.к./пробе.

8. В клиническом материале (моча, мокрота) у больных различными формами туберкулёза специфические антигены микобактерий при использовании туберкулёзных магнитных иммуносорбентов в сочетании с иммуноферментным и количественным иммунофлуоресцентным методами выявлены в 91 %, что подчёркивает высокую диагностическую ценность разработанных препаратов.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Проводить извлечение антигенного материала путём водно-солевой экстракции, механической и ультразвуковой дезинтеграции для получения активных антигенных комплексов микобактерий туберкулёза.
2. Для повышения специфичности сыворотки проводить их иммуносорбцию от гетерологичных антител с помощью аффинных магноиммуносорбентов, полученных иммобилизацией с гетерологичными антигенами, что упрощает и ускоряет процесс очистки.
3. При конструировании суспензионных латексных и алюмосиликатных диагностикумов необходимо опытным путём подбирать нагрузку лиганда, временные и температурные параметры.
4. При получении магноиммуносорбентов для ИФА и КИФА использовать в качестве носителя - алюмосиликат, модификатора - полиглюкин, активатора - вторичный алкилсульфат натрия.
5. Проводить селективное концентрирование на магноиммуносорбенте туберкулёзных антигенов из объектов внешней среды и клинического материала, используя постоянный магнит, магнитные ловушки, с последующей постановкой ИФА, КИФА. Для постановки анализов следует использовать флаконы, пробирки, планшеты.
6. Для получения положительных результатов клинических испытаний препаратов необходимо иметь чёткое представление о специфике выявляемого заболевания, его локализации в организме человека, о свойствах возбудителя микобактерий туберкулёза, правильно проводить подготовку и сбор исследуемых материалов, так как от совокупности знаний этих составляющих зависит качество диагностики.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелян В.А., Африкян Э.Г. Иммобилизация циклодекстрин-гликозил-трансферозы и характеристика полученного биокатализатора // Журн. прикладная биохимия и микробиол. - 1992. - Том 28 №2. - С. 205-209.
2. Адамов А.К. Свойства антител, фиксированных на частицах, и перспективы применения их в микробиологии. Сообщение VI // Журн. микробиол. - 1965. - № 2. - С. 100-105.
3. Адамов А.К., Агафонов В.И. Суспензионные антитела и иммуносорбенты. – М. - 1969. - 175 с.
4. Аксёнова В.А. Эпидемическая ситуация по туберкулёзу у детей в России// Проблемы туберкулёза и болезней лёгких.- 2003. - №8. - С. 57.
5. Алексеев В.В., Быкова О.И., Голосеев Ю.А. и др. Обоснование требований к люминесцирующим иммуноглобулиновым препаратам, предназначенным для количественного иммунофлуоресцентного анализа // Особо опасные инфекции на Кавказе. - Ставрополь, 1987. - С.12-14.
6. Алексеев П. Названы социально значимые заболевания/ Мед. газета. - №100. - 17.12. 2004
7. Аленкина Т.В., Данилина И.В. Применение иммуносорбентов для повышения специфичности диагностических сывороток // Эпидемиологическая безопасность. Итоги и перспективы: Материалы юбилейной науч.-практ.конф., посвящённой 50-летию СтавНИПЧИ.- Ставрополь, 2002. - С.8-10.
8. Алесковский В.В., Юффа А.Я. Модифицирование поверхности неорганическими соединениями // Журнал Всес. Хим. общ. Им. Д.И.Менделеева.- 1989.- № 3.- С.317-324.
9. Андреев Л.В., Склифас А.К. Биохимия и биофизика микроорганизмов.- Горький, 1997.- №5.- С.3-9.
10. Архангельский Н.И., Сихарулидзе А.И. Способ диагностики туберкулёза. А. с. №1171038. Бюл.№29 от 07.08.85.

11. Афанасьев Е.Н. Научно-методические аспекты экспресс-диагностики возбудителей особо опасных зоонозных инфекций (чума, бруцеллез, сибирская язва): Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Ростов, 2000. – 45 с.
12. Афанасьев Е.Н., Таран И.Ф., Тюменцева И.С. Антигенная структура бруцелл. Сообщ. I. Сравнительная оценка методов выделения водорастворимых антигенов бруцелл.– Ставрополь, 1986. – 16с. – Деп. в ВИНТИ, № 6635-B86.
13. Базиков И.А. Разработка новых препаратов для экспрессных методов диагностики сифилиса: Дис. ...докт. мед. наук. – Ставрополь, 2000. – 200 с.
14. Белиловский Е.М. Развитие государственной системы мониторинга туберкулёза, // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких.- 2003. - №8. - С. 58.
15. Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Дергачёв А.В., Гордина А.В., Марьина Н.С., Матвеева М.Б. Заболеваемость туберкулёзом в России: её структура и динамика // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких.- 2003. - №7. - С. 4-11.
16. Бельская Н.А., Митина В.С., Вейнблат В.И. Микрометод фракционирования и идентификация белков // Лаб. дело. – 1972. - № 10. – С.514-616.
17. Бендикене В.Г., Песлякас И.Г., Веса В.С. Хроматография сериновых протеаз на хитине и его производных // Прикладная биохимия и микробиол. - 1981. –Т. 17, №3. - С. 441-447.
18. Березин В.Б., Лахтин В.М., Ямсков И.А. Аффинный хроматографический сорбент, содержащий группировки конканавалина А, иммобилизованного комплексообразованием с кобальтом // Прикладная биохимия и микробиол. - 1995. - Т.31, N 4. - С.400-404.
19. Берёзов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия.- М., 1982. – С.92.
20. Борисенко О.В., Жарникова И.В., Макрушникова А.И., Таран В.И. Разработка новой магнитоуправляемой твёрдофазной иммуноферментной системы для диагностики туберкулёза у людей // X итоговая научная конференция молодых учёных и студентов. Ставрополь.Изд.: СГМА, 2002, С.62

21. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. М.- 2002.- С.437- 441.
22. Брыкалов А.В. Получение биопрепаратов на основе методов аффинной сорбции и иммобилизации: Дисс. ... докт. химич. наук. - Санкт-Петербург, 1993. - 330 с.
23. Брыкалов А.В. Сорбенты на основе кремнеземов и активированных углей в биотехнологии и медицине // Материалы конф. химиков Сев.Кавказа.- Нальчик, 1991.- С.185-186.
24. Брыкалов А.В., Кобанкова А.Н. Синтез и исследование композиционных хитозанкремнезёмных сорбентов биомедицинского назначения // Современные достижения биотехнологии: Материалы 2-ой Всеросс.науч.-техн.конф. - Ставрополь, 12-13 сентября 2002 г. – Т1. - С.135-136.
25. Брыкалов А.В., Ковальков В.И., Тельбух В.П. и др. Способ получения иммобилизованных протеолитических ферментов. Патент № 1084300 А С 12 №11/14 от 27.08.1982.
26. Бусеев А.И., Ефимов И.П. Словарь химических терминов.-М.,1971.- С. 92.
27. Василенко Н.Ф., Кронгауз И.В., Лопаткин О.Н. и др. Способ получения туляремийного антигена / А. с. № 1425910 от 22.05.1988.
28. Вейнблат В.И., Каминский В.В., Орлова Л.С. Иммунодискэлектрофорез антигенов чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 1971. – Вып. 4(26). – С.196-200.
29. Вишневская Е.Б., Бобченко А.П., Мельникова Н.Н. и др. Идентификация L- форм микобактерий туберкулёзного комплекса с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) // Проблемы туберкулёза.-2001. - №3. - С.38-39.
30. Владимцева И.В. Научно-методические аспекты приготовления и использования магнитоуправляемых иммобилизованных микробиологических систем: Автор. ... докт. биол. наук. - Ставрополь, 2002. - 39 с.

31. Владимцева И.В., Плеханова Н.Г., Смирнова В.И., Закревский В.И. Конструирование диагностической тест-системы на основе магносорбентов и липосом // ЖМЭИ. – 1990. - №10. – С.103-106.
32. Власов Г.С., Салов В.Ф., Торчилин В.П., Бердичевский В.Р. Липисомы и перспективы их использования в прикладной иммунологии // ЖМЭИ. – 1982. №8. – С.12-19.
33. Водолазова А.М., Никитина Л.Н. Электрофоретическая характеристика стадии риванолового осаждения иммуноглобулинов // Биологические препараты и иммунологическая реактивность организма. - Томск, 1981. - С.14-15.
34. Гавенский С. Д. , Ефременко В. И., Климова И. М. и др. Применение магнитных сорбентов для концентрирования и выделения чумного микроба из объектов внешней среды (нестерильная почва) // Современ. методы диагност. ООИ и способы их применения. - Методич. пособие Саратов, 1991. - С.35-40.
35. Гавенский С.Д., Пушкарь В.Г. Жизнеспособность микроорганизмов в магнитных иммуносорбентах //Актуальные вопросы профилактики особо опасных и других инфекционных заболеваний: Тез.докл.науч.-практ. конф. 60 лет противочумной службы Кавказа. - Ставрополь, 1995. - С. 116-118.
36. Гаврилова Е.М., Дзантиев Б.В., Егоров А.М. Иммуноферментный анализ: Тез.докл.3-го Всес.науч.симпоз. "Получение иммобилизованных ферментов в научных исследованиях, промышленности и медицине"-Л., 1980. - С.37-38.
37. Гайда А.В., Староверов С.М. Модифицированные кремнезёмные носители в биотехнологии // Журн. Всесоюзного хим. общества им.Менделеева.- 1989. - Т34. № 3. - С. 356-363.
38. Герстунбергер М.Р., Сухоруков Г.Б., Радченко И.Л. и др. Новый метод получения биополимерных микрокапсул для создания лекарственных средств // Биотехнология- состояние и перспективы развития: Материалы 1-го Международн. Конгресса. - М, 2002. - С.54.

39. Гинзбург А.Л. Генодиагностика инфекционных заболеваний // Журн. микробиол. - 1998. - №3. - С.86-95.
40. Гонтарь И.П., Зборовский И.А., Александров А.В и др. Иммуномодулирующий эффект магносорбентов в терапии ревматических заболеваний // V Российский национальный конгресс "Человек и лекарство": Тез. докл. – 1998. – С.35.
41. Гучетль Е.В., Пономарёва Л.П. Опыт определения противотуберкулёзных антител в краевом противотуберкулёзном диспансере Краснодар // Клиническая лабораторная диагностика. - 2002. - №9. - С.36
42. Дмитриев Г.А., Киселёва Т.А. Применение ИФА для серодиагностики сифилиса // Актуальные вопросы дерм. и венер.: Сб.тр. юбил конф., посвящ. 5-летию созд. кож. и вен. болезней педиатр. фак.РГМУ - М., 1997. - С.36-37.
43. Домарадский И.В. Проблемы перекрёстного иммунитета// Проблемы туберкулёза.-1994. - №1. - С.13-17.
44. Дробкина Р. Микробиология туберкулёза. М., 1963.-255с.
45. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. – М., 1983. - С. 348, 352.
46. Дячина М.Н., Лукин Ю.В., Зубов В.П. и др. Микротитрационный вариант реакции латекс-агглютинации в диагностике лепры // Клин.лабат.диагн. - 1995. - №2. - С.24-26.
47. Елистратов Г.Д., Волчанова М.И., Малыгин И.В., Гирда Т.В. Способ получения сорбента // БИПМ.-№ 3. –2004.- С. 629.
48. Елистратов Г.Д., Волчанова М.И., Малыгин И.В., Шолошов А.П., Стрелков В.П., Гнутов В.Г., Григорьев Г.А., Гаськов Д.Г. Способ получения сорбента // БИПМ.-№ 3. –2004.- С. 629.
49. Ерохин В.В. Сотрудничество Российских фтизиаторов с международными организациями // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких.- 2003. - №8. - С. 57.
50. Ерохин В.В., Земякова В.С., Уварова О.А., Казак Т.И., Суркова Л.К., Ариэль Б.М., Краснов С.А. Патологоанатомическая диагностика прогресси-

рующих форм туберкулёза лёгких в связи с новой клинической классификацией // Проблемы туберкулёза.- 1996. - №4. - С. 32-36.

51. Ерохин Е.П. Метод пассивной агглютинации полимерных дисперсий для диагностики легионеллеза // Журн. микробиол. – 1991. - № 11.- С. 41-43.

52. Ефременко В.И. Липосомы. Монография.- Ставрополь, 1999.-236.

53. Ефременко В.И. Магнитоуправляемые иммобилизованные системы в микробиологическом мониторинге природных очагов и объектов внешней среды на наличие возбудителей опасных инфекционных болезней // Журн. микробиол. – 1997. - №2. - С.102-106.

54. Ефременко В.И., Брыкалов А.В., Жарникова И.В. Новые препараты для диагностики и ветеринарно-санитарного мониторинга // Пища. Экология. Человек : Тез.докл. междун. научн.-технич. конф. - Москва, 1995. - С. 206.

55. Ефременко В.И., Климова И.М., Трофимов Е.Н.. Магнитный иммуноферментный анализ антигенов чумного микроба // Журн. микробиол. - 1989. - № 7. - С.62-66.

56. Ефременко В.И., Тюменцева И.С., Василенко Н.Ф. и др. Разработка технологической линии производства в методах иммуноанализа микроорганизмов: Заключительный отчет о НИР, инв. № 02.9.70001181.– Ставрополь,1996. – 96 с.

57. Жарникова И. В., Брыкалов А. В., Тюменцева И. С. и др. И. Разработка твердофазной реакции иммунофлюоресценции (РИФ) на основе композиционных магноиммуносорбентов // Соврем. достиж. биотехнол.: Тез.докл. Первой конф. Северо-Кавказ. региона. - Ставрополь, 1995.- С. 87- 88

58. Жарникова И.В. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей Авт. док. дис...2005.

59. Жарникова И.В. Структурированный керамический носитель с магнитным материалом для иммобилизации антител // Биотехнология.- 2004. - №1.- С.71-79.

60. Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н, Ефременко В.И., Жданова Е.В., Борисенко О.В. Биотехнология иммуносорбентных диагностикумов для выявления возбудителей особо опасных и других инфекций.// Материалы 2-ой Всероссийской научно-технической конференции. Современные достижения биотехнологии. - Ставрополь, 12-13 сентября 2002. - С.162-164.
61. Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Ефременко В.И., Афанасьев Е.Н., Бинатова В.В. Способ получения иммуносорбента (варианты) / Патент на изобретение № 2138813 6 G 01 N 33/543, А 61 К 39/385, С 12 N 11/14. Зарегистр. в Гос. реестре изобретений РФ 27.09.99 г. Бюл.№ 27.
62. Жердева В.В., Чудинов А.В., Савицкий А.П. Разработка иммунофлуоресцентного анализа с временным разрешением для определения гормона тироксина в сухих пятнах крови // Биотехнология - состояние и перспективы развития: Тез.докл. 1-го Междун. Конгресса. – М., 2002. - С.56.
63. Жилченко Е.Б., Ефременко В.И. Подготовка проб воды открытых водоемов для выявления токсигенных штаммов возбудителя холеры // Эпидемиологическая безопасность. Итоги и перспективы: Тез.докл. юбилейной науч.-практ.конф. - Ставрополь, 2002. - С.105-106.
64. Журавлёв М.В., Арсенина Л.В., Виноградова И.Л., Проваторова Л.В.Эпидемиология и некоторые аспекты лабораторной диагностики туберкулеза// Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней.М.- 2002. – Вып.4.- С.194-197.
65. Закревский В.И. Некоторые аспекты применения липосом в диагностике, профилактике и лечении инфекционных заболеваний // Молек. генетика, микробиол. и вирусол. – 1985. - №1. – С.3-8.
66. Закревский В.И., Подзолков В.В., Мельников В.А. Способ включения веществ в липосомы: А.с. № 1005791, СССР, 1983.
67. Иванов Ю.В., Коровкин С.А. Флюоресценция с временным разрешением и ее применение для диагностики ООИ // Материалы VII съезда Всеросс. общества эпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 1997. - Т. 1. - С. 442.

68. Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулёза. Приложение № 11 к приказу №109.М., 2003.
69. Инструкция по унифицированным методам микроскопических исследований для выявления кислотоустойчивых микобактерий в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приложение № 10 к приказу №109.М., 2003.
70. Калинина О.А., Емельянова И.В., Локтионова М.А. ИФА в серодиагностике сифилиса // Совр. вопр. дермато-венерологии: Сб. юбил науч. Тр., посвящ.70-летию обл.кож.- вен.дисп.г. Курска. – Курск.- 1997.- С.65-67.
71. Канюк А.Н. Комплексные бактериологические исследования в диагностике туберкулёза // Туберкулёз и экология.- 1995. - №3.-С.31-33.
72. Карпенко В.В., Сачков В.И. Обезболивание животных в эксперименте: Метод. рек. – М., 1985. – 53 с.
73. Карпов С.П., Прегер С.М., Синельников Г.Е. и др. Гипериммунные сыворотки. – Томск, 1976. – 378 с.
74. Кейтс М.Техника липидологии. М. Мир, 1975.-С.68-82.
75. Кельцев Н.В. Основы адсорбционной техники .-М: Химия,1984. - С. 280.
76. Киселев А.В., Кустова Т.Л. Способ приготовления аэросилогелей // А.с. N 264369 . -1976.
77. Кислицын Ю.В., Мешандин А.Г. Способ определения наличия противомозговых антител в ликворе. Заявка № 2000127007/14, Бюл № 20.- 20.06. 2002.
78. Клименко М.Т., Гинзбург Т.С., Сокало С.В. Результативность биологического и культурального методов исследования при диагностике туберкулёза // Проблемы туберкулёза - 1987.- №8.-С.70-73.
79. Клименко М.Т., Гинзбург Т.С., Сокало С.В., Бочко И.В., Крикун А.И. Микробиологическая диагностика туберкулёза почек // Проблемы туберкулёза- 1985.- №8.-С.37-40.

80. Клячко-Гурвич А.А. Методы определения удельной поверхности //Из-во АН СССР. – 1964. - № 10. – С.1885.
81. Коваленко Г.А, Комова О.В. Симаков А.В. и др. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов //Биотехнология.-2002. - №3. - С.55-66.
82. Кольцов С.И., Алесковский В.Б. Силикагель, его строение и физико-химические свойства. - Л: Госхимиздат, 1973. - С.96.
83. Коротченко С.И. Состояние и перспективы борьбы с туберкулёзом// Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней.М.- 1999. – Вып.3.- С.139-142.
84. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. СПб, 2002.- С.480-481.
85. Кузовлева А.А., Шаханина К.Л. Сравнение различных способов иммобилизации препаратов чистых антител и неспецифических иммуноглобулинов // Лаб.дело. - 1982. - N 3. - С.9-12.
86. Кузовлева А.А., Шаханина К.Л. Сравнение различных способов иммобилизации препаратов чистых антител и неспецифических иммуноглобулинов // Лаб.дело. - 1982. - N 3. - С.9-12.
87. Кулаков Ю. К., Горелов В. Н., Мотин В. Л. и др. Высококчувствительная неизотопная система гибридизации ДНК с применением амплификации (ПЦР) для идентификации бруцелл // Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол. – М., 1992. - № 7 - 8. - С. 23.
88. Куличенко А.Н., Попов Ю.А., Наумов А.В. Детекция возбудителей особо опасных инфекций в биологическом материале и объектах внешней среды с помощью полимеразной цепной реакции. // Актуал. вопр. профилакти. Особо опас. и других инфекционных заболеваний: Материалы науч.-практ.конф. - Ставрополь, 1995. - С.175-176.
89. Куличенко А.Н., Попов Ю.А.,Опочинский Э.Ф. и др. Методические указания по детекции патогенной микрофлоры в клиническом материале,

пищевых продуктах, объектах внешне среды и выполнению генетической идентификации клеток с помощью полимеразной цепной реакции.- М.,1996. - 11с.

90. Кунижев С.М., Воробьёва О.В., Денисова Е.В. и др. Разработка способа получения универсальной матрицы для энтеросорбентов // Биотехнология- состояние и перспективы развития: Материалы 1-го Международного Конгресса. - М., 2002. - С.75.

91. Лавриненко И.А., Костровский В.Г. Использование высокоёмких иммуноносителей при определении антител к вирусу иммунодефицита человека // Журнал микробиол. –1997. -№1. - С.18-22.

92. Лазовская А.Л., Воробьёва З.Г., Слинина К.Н. Способ выявления микобактериальных антигенов. Патент № 2188428, Бюл.№24. - 27.08.2002.

93. Лазовская А.Л., Воробьёва З.Г., Слинина К.Н. Способ выявления микобактериальных антигенов. Патент № 2188428, Бюл.№24. - 27.08.2002.

94. Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В. Актуальные вопросы туберкулёза и других гранулематозных заболеваний// Сборник материалов науч.-практ. конференции молодых учёных.- М., 2001.- С.28-29., 2001

95. Ларионова Е.Е., Кузьмин А.В., Васильева И.А., Сравнительная характеристика молекулярных и микробиологических методов контроля химиотерапии у впервые выявленных больных туберкулёзом лёгких// Проблемы туберкулёза и болезней лёгких.- 2004. - №6. - С. 31-34.

96. Лисичкин Г.В. Достижения, проблемы и перспективы химического модифицирования поверхности минеральных веществ // Журн. Всесоюз. хим. общества им.Менделеева. –1989.-Т.34, № 3. - С. 291-297.

97. Литвинов В.И. Иммунодиагностика туберкулёза // Проблемы туберкулёза- 1996.- №1.-С.56-59.

98. Литчфилд У.Д., Фрейтаг Д.У. Иммуноанализ с помощью ферментов, заключенных в липосомы // М., 1998. – С.122-129.

99. Лопаткин О.Н., Кронгауз И.В. Оптимизация параметров метки иммуноглобулинов изотиоцианатом флуоресцеина // Болезни с природной очаговостью на Кавказе: Тез. докл. - Ставрополь, 1982.- С.173-175.
100. Лопаткин О.Н., Кронгауз И.В. Повышение специфичности сывороток при использовании метода твёрдофазной адсорбции// Профилактика чумы и других природно-очаговых инфекций: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. – Ставрополь, 1983. – Т.2. – С.81-82.
101. Лопаткин О.Н., Кронгауз И.В. Усовершенствование иммуноферментного метода для диагностики туберкулёза у людей и крупного рогатого скота//Современные аспекты природной очаговости, эпидемиологии и профилактики о.о.и. заболеваний:Тез. докл.научной конф. В Омске- Ставрополь, 1993.- С.229-230.
102. Лопаткин О.Н., Фунтикова Т.Н., Буравцева Н.П. и др. Эффективность различных схем иммунизации кроликов при получении диагностических сибирязвенных капсульно-соматических сывороток // Профилактика чумы и других природно-очаговых инфекций: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. – Ставрополь, 1983. – Т.2. – С.91-92.
103. Лукин Ю.В., Трифонов В.Д., Туркин С.И. и др. Полиакролеиновые латесы в качестве иммунореагентов // Тр. МХТИ.- 1985. - Вып. 185. - С. 88-92.
104. Марголис Л.Б. Механизмы взаимодействия липосом с клетками: перспективы и ограничения применения липосом в науке и практике //Биол. мембраны. – 1987.-Т.4, №5. – С.453-467.
105. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками // М.:Наука, 1986. – 240 с.
106. Масько А.А., Морозова А.А., Лыга Л.К. и др. Иммобилизация трипсина на углеволоконистых носителях, различающихся структурой, пористостью и химией поверхности // Прикладная биохимия и микробиология. -М., Наука, 1992. -Том 28, №2. - С. 211-216.

107. Маякова Т.И., Кузнецова Э.Э., Ковалёва М.Г. , Плюснин С.А., Сокольникова Н.А., Мазутова М.С. Быстрое выявление микобактерий туберкулёза методом хромато-масс-спектрометрического селективного ионного мониторинга// Проблемы туберкулёза.- 1995. - №6. - С. 16-20.
108. Медицинская и санитарная микробиология. Под ред. Воробьёва А.А., Кривошеина Ю.С., Широбокова В.П.-М., 2003.-С.213-217.
109. Медицинская микробиология. Под ред. Покровского В.И., Позднеева О.И. М.,1998.-С.499-509.
110. Методические указания «Микробиологические исследования при выявлении, диагностике и лечении туберкулёза». М, 2001.
111. Милютина Л.Н., Скопинская С.Н., Ярков С.П. Липосомальный иммуноанализ в диагностике сальмонеллеза у детей //Эпидемиол. и инф. болезни. – 1996. – № 3. – С.48-52.
112. Муромец В.И., Наградова Н.К. Иммобилизованные олигомерные ферменты. - М: Наука, 1984. - С.10.
113. Носков Ф.С. Очистка конъюгатов от непрореагировавшего флюорохрома // Иммунологическая диагностика вирусных инфекций / Под ред. Т.В.Перадзе, П.Халонена. - М.,1985.-С. 254.
114. Носков Ф.С. Флуоресцирующие антитела и их применение в вирусологии.- В кн.: Респираторные вирусные инфекции. - Л.,1969. - С.217-242.
115. Ометов В.К., Моргуль М.П., Уразовская Е.В. и др. О применении иммуноферментного анализа в диагностике сифилиса // Вестн. дермат.- 1997.- №3.- С.24-35.
116. Онищенко Г.Г. (Материалы к докладу) – Главного государственного санитарного врача РФ на VIII Всероссийском съезде эпидемиологов, микробиологов и паразитологов// М., 26-28 марта 2002.
117. Онищенко Г.Г. Эпидемиологическая ситуация в Российской Федерации и меры по её стабилизации// Проблемы туберкулёза и болезней лёгких.- 2003. - №11. - С. 4-9.

118. Остро М.Д. Липосомы // В мире науки. – 1987. Т3. – С.71-79.
119. Пекшев А.В., Елагин Г.Д., Пятков В.А. Разработка эритроцитарного диагностикума для обнаружения и идентификации возбудителя туляремии // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: Материалы юбил. науч. конф., посвящ. 70-летию НИИ микробиологии МО РФ (30 ноября - 1 декабря 1998). - Киров, 1998.- С. 185.
120. Петров Р.В. Иммунология. М., Медицина.-1983.-С.5-16.
121. Петрухина М.И., Русакова Е.В., Ющенко Г.В. Эпидемиологический надзор за туберкулёзом в современных условиях// ЖМЭИ. – 2003.-№5.-С.93-96.
122. Подзолкова Г.Г., Климова И.М, Ефременко В.И. и др. Применение количественной иммунофлуоресценции для определения адсорбционной способности магнитных иммуносорбентов // Журн. микробиол. – 1988. - № 5. – С.56-58.
123. Подзолкова Г.Г., Климова И.М., Ефременко В.И. и др. Количественный иммунофлуоресцентный скрининг твердофазных носителей различной природы как основа для магноиммуносорбентов // ООИ заболеваний: диагност., профилактикт. и биологич. свойства возбудит.: Сборн. научн. работ. – Волгоград, 1989. – Вып. 4. – С.63-69.
124. Подоляко М.П., Баташев В.В., Уралева В.С. и др. Иммуноферментный метод обнаружения бруцеллезных антител и антигена в сыворотках крови животноводов из неблагополучных по бруцеллезу хозяйств // Журн. микробиол. - 1995. - № 6. - С. 53 – 54.
125. Постнова А.М., Пак В.Н., Кольцов С.И. Исследование протонной кислотности титаносодержащих силикагелей, полученных методом молекулярного наслаивания // Журн. физ.химии. - 1981. - Т.35, N8. - С.2140-2142.
126. Приказ № 109. О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской федерации. М., 2003.

127. Приказ № 558. Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулёзе. М., 1978.
128. Пунга В.В., Капков Л.П. Туберкулёз в России // Проблемы туберкулёза-1999.-№1.- С.14-16.
129. Пушкарь В.Г., Климова И.М., Ефременко В.И. и др. Приготовление и применение магнитных сорбентов для изучения антигенов микроорганизмов // Метод. рекоменд. - Волгоград, 1984.- 15 с.
130. Пушкарь В.Г., Трофимов Е.Н. Иммунофлуоресцентный анализ антигенного материала, фиксированного на магнитных полиакриламидных сорбентах //Актуальные вопросы иммунодиагностики особо опасных инфекций: Тез.докл. Всесоюз. науч.-практич. конф.(26-27 мая, 1986). - Ставрополь, 1986. - Ч.II. - С.50-53.
131. Ревенко Л.Г., Ротов К.А., Васильев В.П., Ефременко В.И. Иммобилизация иммуноглобулинов на поверхности липосом методом ковалентного связывания // Сб. научных работ "Особо опасные инфекционные заболевания: диагностика, профилактика и биологические свойства возбудителей. – Волгоград, 1990. – В. 4. – С. 70-73.
132. Рекомендации для национальных программ ВОЗ, 1978;
133. Рогожина С.В., Варламов В.П., Вальковский Д.Г. Получение модифицированных кремнеземов для присоединения биологически активных соединений // Изв. АН СССР. – 1975. - № 8. – С.1718-1721.
134. Ротов К.А., Климова И.М., Васильев В.П. с соавт. Выявление антигенов в применении липосом в радиоиммуноанализе // Матер. Рос. научн. конф. Тез. докл. (Волгоград, 21-22 окт., 1992). – Волгоград. – 1992. – С.168.
135. Русакова Е.В., Иваненко Г.П., Иванова И.Н. и др. Состояние и перспективы борьбы с туберкулёзом //Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней.М.- 2002. – Вып.4.- С.186-190.
136. Самсонова С.А., Самсонов В.В., Гудима М.Ю. и др. Методы ПЦР для паспортизации и классификации микроорганизмов // Биотехнология-

состояние и перспективы развития: Материалы 1-го Междунар. Конгресса.- М., (14-18 октября) 2002. - С.176.

137. Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е. //Материалы 9-го Национального конгресса по болезням органов дыхания.- М., 1999.- С.122.

138. Скачек Д.В. Научно-методические основы стандартизации люминесцирующих иммуноглобулинов для диагностики возбудителей особо опасных инфекций. - Автореф. дисс. ... канд.мед.наук. - Саратов, 1984. - 173.

139. Скуч Д., Уэст Д. Основы аналитической химии. - М: Мир, 1979. - Т.1. - С.71-73.

140. Смирнов В.В., Чаплинский В.Я., Андреева З.М. и др. Научные основы производства диагностических препаратов (Сыворотки для идентификации энтеробактерий). – Киев: Наукова Думка, 1980. – 195с.

141. Стоев К.Г., Чибисова В.А., Шаханина К.А. и др. Новый количественный иммунофлуоресцентный метод определения IgE с помощью специфического сефарозного иммуносорбента и люминесцентного микроскопа // Журн. иммунология. - М,1981. - N1. - С.85-88.

142. Сухоруков А.М., Пономарёва А.М. Изучение сорбционных свойств полистироловых планшетов, используемых в иммуноферментном анализе // Журн. микробиол.- 1987.- №9.-С.18-22.

143. Сюнамото Дзюндзо, Акиёси Кадзунари, Сато Тосинори. Роль липосом в биологических дисциплинах // Biosci. and Ind.-1989. V.47, N 5. – P. 475-485.

144. Табаков П.К, Чибрикова Е.В., Шуркина И.И. и др. Быстрый способ получения меченых флуоресцентными красителями антител // Журн. микробиол. - 1962. - Т 10. - С.26-30.

145. Тамбовцев Е.П., Ахметкалиев С.Г., Пятницкий Н.П. Методы статистической обработки результатов серологических реакций // Журн. микробиол. - 1969.- №10.-С.26-31.

146. Таран И.Ф., Лопаткин О.Н. Итоги изучения и перспективы усовершенствования диагностических иммуноглобулиновых препаратов в научно-

исследовательском противочумном институте Кавказа и Закавказья //Особо опасные инфекции на Кавказе: Тез. докл. V краев. науч.-практич. конф., посвящен. 50-летию образов. противочум. службы Кавказа (17-19 сентября 1985). - Ставрополь, 1985. -В.11. - С.15-21.

147. Темишевская Л.Я. Использование техники иммобилизации клеток для непрерывного культивирования токсинообразующих анаэробов // Журн. микробиол.- 1995.- №6. - С.21-22.

148. Тишин А.М., Спичкин Ю.И. Пористый магнитный сорбент // БИПМ.-№9. –2004.- С. 643.

**149.** Ткаченко Е.А. Применение твердофазных иммуносорбентных методов (энзимного и радиоиммунологического анализа) для лабораторной диагностики аренавирусных инфекций, крымской геморрагической лихорадки и геморрагической лихорадки с почечным синдромом //Методические рекомендации. - М.,1982. - 21 с.

150. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. - М:Мир, 1983. - С.23.

**151.** Тунгусова О.С., Марьяндышев А.О. Молекулярная генетика микобактерий туберкулёза //Проблемы туберкулёза.-№2.- 2003.- С.43-45.

152. Тюменцева И.С., Ефременко В.И., Афанасьев Е.Н. и др. Индикация возбудителей ООИ с помощью композиционных магноиммуносорбентов //Актуал. вопр. профилакт. чумы и др. инфекц. заболеваний: Материалы межгос. науч. – практ. конф., посвящ. 100-летию открытия возбуд. чумы.- Деп. в ВИНТИ 25.01.95 г.- N 221- В 95.- С. 72-77

153. Тюменцева И.С. Научно-методические основы конструирования и усовершенствования производства диагностических тест-систем для выявления возбудителей ОО и других инфекций: Автореф. дис. ... доктор. мед. наук. – Саратов, 1996. –57 с.

154. Тюменцева И.С., Жданова Е.В., Афанасьев Е.Н. Усовершенствование производственной схемы иммунизации животных моно- и поликомпонентны-

ми антигенами - Ставрополь, 1994 г. – 15 с. -Деп. в ВИНТИ 04.11.94, № 2507-В94.

155. Умнова Н.С., Павлова И.П., Михеева Г.В. и др. Приготовление иммунопероксидазных препаратов для диагностики особо опасных инфекций // Актуальные вопросы иммунодиагностики особо опасных инфекций: Тез.докл. Всесоюз.конф. (26-27 мая 1986).- Ставрополь, 1986.- Ч.2.- С. 95-98.

156. Фихте Б.А. Дезинтеграция микроорганизмов. Задачи и перспективы // В сб.: Дезинтеграция микроорганизмов: Матер. Всесоюзн. конф. по дезинтеграции микроорганизмов (25-27 окт., 1972 г.) - Пушкино-на-Оке, 1972. - С.5-14.

157. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. - М: Мир, 1980. - С.73.

158. Фримель Г. Иммунологические методы. М., 1987.-С.110-112.

159. Фролова О.П.Проблемы туберкулёза у больных ВИЧ-инфекцией // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких.- 2003. - №8. - С. 58.

160. Фролова Ф.Н., Кулаков И.М., Зайнутдинова Н.Г., Фатыхова Р.Х. О заболеваемости туберкулёзом в г. Казань// Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней.М.- 2002. – Вып.5.- С.144-146.

161. Хмельницкий Р.А. Физическая и коллоидная химия. Изд. Высшая школа. – М., 1988. - С. 342-343.

162. Ходж Ф. Органические реакции с использованием реагентов или субстратов, ковалентно закрепленных на функционализированных неорганических носителях // Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева. - 1989. - Т.34, N3. - С.331-339.

163. Хоменко А.Г., Авербах М.М., Романова Р.Ю., Горина Л.Г., Литвинов В.И. Способ определения микобактерий туберкулёза в крови больных туберкулёзом. А. с. № 1123128. Бюл.№3 от 23.01.92.

164. Хоменко В.А., Александров М.Т., Брагина М.Н., Смирнова В.В., Лизунова И.А. Применение метода ЛФД для диагностики и оценки эффективности лечения внелёгочного туберкулёза/ Клиническая лабораторная диагностика.- 9.- 2004.- С. 37.

165. Хохлова Т.Д., Гаркавенко Л.Г., Никитин Ю.С. Адсорбция белков и ДНК на дегидроксилированных и алюминированных силихромах// Прикладная биохимия и микробиология.- М., Наука. 1991. – Т. 27, №5. - С. 720-724.
166. Черкасов А.Н., Пасечник В.А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. - Л., 1991. - 239 с.
167. Черноусова Л.Н., Ларионова Е.Е., Денисова Т.С. и др. Генодиагностика в современной медицине// Материалы Всероссийской науч.-практ. конференции.- М.2000.- С.291-292.
168. Чибисова В.А. Приготовление и стандартизация люминесцирующих сывороток для непрямого метода иммунофлуоресценции: Автореф. дисс. ... канд. мед наук. - М., 1975. - 25 с.
169. Чутаев Ю.П., Падерин В.Ф., Теряева М.В. Диагностические возможности метода внутрикожного введения денатурированного гамма-глобулина при кониотуберкулёзе внутригрудных лимфатических узлов// Проблемы туберкулёза.- 1996. - №4. - С. 16-17.
170. Шаханина К.Л. Иммуносорбенты и их использование для выделения чистых антител // Биохим. и биофиз. микроорганизмов. -1981. - В.9. - С.15-23.
171. Шаханина К.Л. Приготовление люминесцирующих антител. -В кн.: Иммунофлуоресценция в медицине. - М.:Медицина, 1977. -С.23-46.
172. Шаханина К.Л., Манько М.И. Избирательное концентрирование бактерий и риккетсий при помощи поликонденсационных иммуносорбентов //Журн. микробиол. - 1969. - N9 -С.140-144.
173. Шаханина К.Л., Походзей И.В. Приготовление сефарозных пневмококковых диагностикумов и их использование в клинике легочных заболеваний // Журн. микробиол. - 1978. - N3. - С.75-79.
174. Шаханина К.Л., Соколенко А.А., Павлова И.П. Выбор критериев пригодности твёрдофазных носителей на основе полистирола для проведения иммуноферментного анализа // Журн. микробиол. - 1987. - N9 -С.86-89.

175. Шевченко Ю.Л. Приказ № 109 от 21.03.2003. О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в РФ // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких.- 2003. - №11. - С. 57.
- 176.** Шешуков П.Ф., Готовский Ю.В. Некоторые аспекты современной диагностики туберкулёза // Материалы 8-й международной конференции «Теоретические и клинические аспекты применения биорезонансной и мультirezонансной терапии». М., 2002.- Ч.1.-С.167-169.
177. Щедрин В.И., Сбойчинов В.Б., Волков В.И. Сравнительная оценка двух иммуноферментных тест-систем для серодиагностики сифилиса // Актуальные вопросы дерматологии: Сб.тез.докл.науч.-практ.конф., посвящ. 125-летию созд.кож. и вен. болезней.- С-Пб., 1994.- С.81-82.
178. Яковлев А.Т. ИФА в лабораторной диагностике бактериальных особо опасных инфекций: Автореф. дисс. ... доктора мед. наук.- Саратов, 1992.- 43 с.
179. Anaokar S., Garry P.J., Standefer J.C. Solid-phase enzyme immunoassay for serum ferritin //Clin.Chem.- 1979. - V.25. - P. 1426-1431.
180. Ansari A.A. et. al., Purification antigemoglobin antibody using cross-einked immunoabsorbent //S. immunol. Methods. -1981. - V. 42. - N 1, P. 45-51.
181. Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. Rev Sci Tech 2001; 20: 325-37.
182. Badak FZ, Goksel S, Serto B, Ermertcan S, Cavusoglu C, Bilgic A. Use of nucleic acid probes for identification *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. J Clin Microbiol 1999; 37: 1602-5.
183. Beuntner E.H., et al. A reveals immunodiffusion assay for antibody protein concentration in antisera or conjugates to human IgG //Standartization in immunofluorescence. - Oxford. Blackwell Scientific Publ, 1970. - Pat.2. - P.165-169.
184. Bricker B.J., Ewalt D.R., MacMillan A.P. et al. Molecular Characterization of Brucella Strains Isolated from Marine Mammals //J. Clin Microbiol.- 2000.- Vol.38(3).- P.1258-1262.

185. Burt F.J., Leman P.A., Smith J.F., Swanepoel R. The use of a reverse transcription – polymerase chain reaction for the detection of viral nucleic acid in the diagnosis of Crimean – Congo hemorrhagic fever //J.Virol. Methods. – 1998. – Vol.70, N2. – P. 129-137.
186. Bushway R.J., Perkins L.B., Hurst H.L., Ferguson B.S. //Food chemistry.- 1992. - V.43. - P. 283.
187. Butler WR, Jost KC, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. J Clin Microbiol 1991; 29: 2468-72.
188. Butler WR, O'Connor SP, Yakus MA, Gross WM. Cross-reactivity of genetic probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with newly described species *Mycobacterium celatum*. J Clin Microbiol 1994; 32: 536-8.
189. Camargo Z., Guesdon J.L., Drouhet E. Magnetic enzyme-linked immunosorbent assay (Melisa) for determination of specific IgG in paracoccidioidomycosis //Sabouraudia.- 1984. - V.22, N 4. - P.291-299
190. Chim C., Wold F. The preparation of matrix - bound proteases and their use in the hydrolysis of proteins // Anal.Biochem. - 1974. - V. 61., N 2. - P. 379-391.
191. Cholera-gen – mediated release of trapped glucose from liposomes containing ganglioside Gm1 /Moss J., Fishman P.H.,Richards R.L. et al. //Proc.Nat. Acad. Sci USA. – 1976. – V.73, № 10. – P.3480-3483.
192. Chua M.-M., Fan S.-T., Karush F. Attachment of immunoglobulin to liposomal membrane via protein carbohydrate //Biochim. et biophys. acta: Gen. Subj. – 1984. - № 3. – P.291-300.
193. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus // J. Gen. Virol. – 1977. – V.36, №3. – P.475-483.
194. Coons A.H., Greech H.G., Gones A.N. et al. The demonstration of pneumococcal antigens in tissue for the use of fluorescent antibody // J.Immunol.- 1942.-V. 45, N 3.- P. 159-170

195. Coons A.H., Kaplan M.H. Localisation of antigen in tissue cells // J. Exp. Med. – 1950. – V.91, N 1. – P.81-89.
196. Cunliffe D, Smart C.A., Tsibouklis J. et al. Bacterial adsorption to thermoresponsive polymer surfaces // Biotechnol. Lett.- 2000.-22. N 2.-P.141-145
197. Dankner WM, Davis CE. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. Pediatrics 2000; 105: E79.
198. Dankner WM, Waecker NJ, Essey ME, Moser K, Thompson M, Davis CE. *Mycobacterium bovis* infection in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. Medicine (Baltimore) 1993; 72: 11-37.
199. Deng Shaoli, Yang Yuan. Zhongguo xiandai yixue zazhi. // J. Mod. Med. China – 2002. – 12.№18. – C. 37-41.
200. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull WHO 1994; 72:213-20.
201. Drosten C., Gottig S., Schilling S. et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Cremean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR //J.Clin. Microbiol.-2002.-Vol.40,N7.-P.517-523.
202. Duffey PS, Guthertz LS, Evans GC. Improved rapid identification of mycobacteria by combining solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography analysis of BACTEC cultures. J Clin Microbiol 1996; 34: 1939-43.
203. Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G // Immunochemistry. - 1971. - V.8., N 9. - P. 871-879.
204. Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Tsygancova O.I. et al. Scheme for isolation and identification of *Bacillus anthracis* // Proceeds of the 1st European Conference on Dangerous Pathogens. - Winchester (England), 1999. – P.43.

205. Ficapal A, Alonso-Urmeneta B, Velasco J. et al. Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate // Vet. Rec. – 1995. – V. 5137, N 6. – P. 145-147.
206. Flechtner M.D., Bieniaz C., Shipchandier M., Adamczyk M. Fluorophores for encapsulation into liposomes: Pat. N 4912208, USA, 1990.
207. Ford EG, Snead SJ, Todd J, Warren NG. Strains of *Mycobacterium terrae* complex which react with DNA probes for *M. tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1993; 31: 2805-6.
208. Frieden Thomas R., Driver Cynthin R. Tuberculosis control: Past 10 years and future progress // Tuberculosis – 2003.-№1-3.- C.82-85.
209. Gall D., Nielsen K., Forbes L. et al. Alidation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison // J. Wildl. Dis. – 2000. – Vol.36(3). – P.76-469.
210. Gangadharam PRJ, Droubi AJ. Identification of mycobacteria by smear examination of the culture. Tubercle 1981; 62: 123-7.  
Ged. – 1949. – V.261, N 14. – P.1-9.
211. Goto M, Oka S, Okuzumi K, Kimur S, Shimada K. Evaluation of acridinium-ester labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol 1991; 29: 2473-6.
212. Greenlee M.T., Farrar .J.A., Hird D.W. et al. Comparison of particle concentration fluorescence immunoassay to card and complement fixation tests using isolation of *Brucella abortus* as the standard // J. Vet. Diagn. Invest. – 1994. – V. 6 (2). – P.182-187.
213. Guesdon J.L., Avrameas S. Solid-phase enzyme immunoassay //Appl. Biochem. and Bioeng. - 1981. - V. 3. - P.207-232.
214. Harding N. Laboratory equipment digest // J.immunol. Meth. - 1982. - V.20,- N 4.- P. 89-93.

215. Heifets LB, Jenkins PA. Specication of mycobacteria in clinical laboratories. In: Gangadharam PRJ, Jenkins PA, editors. Mycobacteria I basic aspects. USA: Chapman&Hall; 1998 p 308-50.
216. Hornung M., Ludwic M, Schmauder H.P. A New Technology for an optimised supply of emerged microbial cultures // 1-st International congress. Biotechnology- state of the art and prospects of development/ Russia. Moscow, (14-18 октября) 2002. - С.202.
217. Interaction between glycoporphin and ganglioside Gm<sub>1</sub> on liposomal membranes. Effect of the interaction on the susceptibility of membranes to HVI /Umeda M., Kanda S., Nojima S. et al. //J. Biochem. – 1984. – V. 96, № 1. – P.229-236.
218. Jakubowiak W, Komourzaeyev B, Dara M, Punga V, Ausheva E, Testov VWHO TB Control Programme in North Caucasus, a model for TB control in conflict zones // 34<sup>TH</sup> World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Atlanta, GA, USA.-V. 7, № 11, 2003.- P. 290.
219. Kato K., Hamguchi Y., Fukui H. et al. Enzyme-linked immunoassay. Novel method for synthesis of the insulin – D - galactosidase conjugate and its applicability for insulin assay // J.Biochem.- 1975. - V. 78. - P. 235-237.
220. Kent PT, Kubica GP, editors. Public health mycobacteriology, a guide book for the level III laboratory. Center for disease control. Atlanta, Geogia, 1985; 71-
221. Kent PT, Kubica GP, editors. Public health mycobacteriology, a guide book for the level III laboratory. Center for disease control. Atlanta, Geogia, 1985; 71-125.
222. Kluge H, Jakubowiak W, Pashkevich D, Danilova I, Ruybka L, Dara M, Lebrun L, Espinasse F, Povenda J, Vincent V. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 1992; 30: 2476-8.
223. Kriz K., Gerhrke J., Kriz D. Advancementstoward magneto immunoassays. Biosens Bioelectron. – 1998. - V. 13 (7-8). -P.817-823.

224. Lachman P.J. The production of antibodies specific to minor immunoglobulins by the immunization of rabbit paralysed with IgG // In. Standardization in immunofluorescence. - Oxford, 1970. - P. 225-234.
225. Laser-light scattering studies on mixed phosphatidylcholine + GM<sub>1</sub> ganglioside monolamellar vesicles /Masserini M., Sonnino S., Giuliani A., Tettamanti G. et al. //Ital. J. Biochem. – 1984. – V. 33, № 3. – P.179-181.
226. Lea T., Vartdal F., Davies C., Ugelstad J. Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells //Scand. J. Immunol. - 1985. - V.22 , № 2. - P.207-216.
227. Leserman L.D., Aranof D., Barbet J. Et al. Antibody-bearing liposomes as probes of receptor-mediated endocytosis // Receptor-Mediated Target. Drugs. Proc. NATO Adv. Study Inst., Cape Sounion, June 1, 1983. – New York; London, 1984. P. 393-405.
228. Liposomes // Appl. Genet. News. – 1988. – V.8, N10. P.14-15.
229. Liposomes and immunology / Eds. B.N.Tom, H.P. Six Elsevier. – 1980. – P. 345.
230. Lowe C.R., Dean D.G. Affinity Chromatography. London- New-York-Toronto: Wiley- Intersci. Publ., 1974. - P.135.
231. Marshall K., Ridgewee N, Simpson J. The acidity of surface groups of silica // Chem. And Ind. 1974. - V. 19. - P.775-776.
232. Maruyama S., Boonmar S., Morita Y. Seroprevalence of Bartonella henselae and Toxoplasma gondii among healthy individuals in Thailand // J. Vet.Med.Sci.- 2000.-Vol 62, N 6.- P.635-637.
233. McDougall I.R., Dunnick J.K., McNamee M.G., Kriss J.P. Distribution and fate synthetic vesicles in the mouse. A combined radionuclide and spin label study // Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1974, V.71. – P.3487-3491.
234. Miranda A .G. Crisis-driven migrants and the tuberculosis experience // 34<sup>TH</sup> World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Atlanta, GA, USA.-V. 7, № 11, 2003.- P. 113.

235. Molday R.S., Jen S.P.S., Rembaum A. Application of magnetic microspheres in labelind and separation of cells // Nature. - 1977. - V.268. - P.437-438.
236. Murray CJL, Styblo K, Rouillon A. Tuberculosis in the developing countries: burden, invention and cost. Tuber Lung Dis 1990; 65: 6-24.
237. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labelled antibody-a new method of conjugation // J.Histochem. Cytochem. -1974.- V. 22, N 4. - P. 506-508; 1084-1091.
238. Nielsen K., Lin M., Gall D. et al. Fluorescence Polarization Immunoassay: Detection of Antibody to Brucella abortus // Methods. – 2000.- Vol. 22(1). P- 71-76.
- 239.** Nikolayeva O, Shpak O. Diagnosis of mediastinal lymph node tuberculosis // 34<sup>TH</sup> World onference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Atlanta, GA, USA.-V. 7, № 11, 2003.- P. 314.
240. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tubercle Lung Dis 1995; 76: 1.
241. O'Berry P.A. A comprasion of 3 methods of serum fractionation in the preparation of vibrio fetus fluorescent antibody conjugates // J. Vet. Res. - 1964. - V.25. - P.1669-1672.
242. O'Sullivan M.J., Marks V. Method of preparation of enzymatibody conjugates for use in enzyme immunoassay // Meth. In Enzymol.- New.York, 1981. - V. 73. - P.147- 166.
243. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gel. // Arkiv for Kemi. Mineral.
244. Polson A., Potgieter G.M., Largier J.E. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weigh // Biochem. Biophys. Acta. – 1964. – V.82. – P.463-475.
245. Portaels F. Epidemiology of non-tuberculosis Mycobacteria// 34<sup>TH</sup> World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Atlanta, GA, USA.-V. 7, № 11, 2003.- P. 123.

246. Rakisheva A, Erkenova G, Kassenova L. TB prevention among adolescents held in prison conditions // 34<sup>TH</sup> World onference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Atlanta, GA, USA.-V. 7, № 11, 2003.- P.309.
247. Ramadass P., Samuel B.,Nachimuthu K. A rapid latex agglutination test for detection of leprospiral antibodis // Vet.Microbiol.1999.-V. 70, N 1-2.- P.137-139.
- 248.** Recommendations of the Russian Ministry of Health to expand the World Health Organization (WHO) TB control strategy in the Russian Federation based on the experience gained from the TB pilot project implementation // 34<sup>TH</sup> World onference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Atlanta, GA, USA.-V. 7, № 11, 2003.- P. 29
249. Richardson J., Hill A., Luxton R et al. A novel measuring system for the determination of paramagnttic particles labels for use in magetj-immunossays. Biosens Bioelectron.- 2001. - V.16. – P. 1127.
250. Rowe D.S. Production of specific antisera // In.: Standartization in immunofluorescebce. - Oxford, 1970. - P.27-38.
251. Ruiz- Bravo A., Jimenez- Valera M. Perspectivas de la microbiologia: El fufuro inmediato //Ars pharm. – 1996. – V. 37. - N 2. – P.171-181.
252. Small P., van Embden J.D.A.//Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control / Ed. B.R.Bloom.- Washington. 1994.- P. 569-581;
253. Snyder L.R., Kirkland J.J. Introduction to modern liguid chromatography. N.Y.- Wiley, 1979. - 863 p.
254. Somoskövi A, Hotaling JE, Fitzgerrald M, Jonas V, Stasik D, Parsons LM, Salfinger M. False-positive results for *Mycobacterium celatum* with the AccuProbe *Mycobacterium tuberculosis* complex assay. J Clin Microbiol 2000; 38: 2743-5.
255. Steibuch G., Andran R. The isolation of IgG from imanalion serra with the acid of caprilic // Arch. Of Biochem. Stray and Biophys. – 1969. – V.139. – P. 279-284.

256. Sting R., Ortmann G. Erfahrungen mit einfachen ELISA-Testsystemes fur die Brucellose – Serologie bei Rind, Schaf und Ziege //Berlin. Und munch. Wochenschr.- 2000. – Vol.113.- N 1. – P. 22-28.
257. Stortz H. (Шторц Х.) Иммунофлуоресценция //Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987. – С.128-148.
258. Sudre P, Ten Dam HG, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. Bull WHO 1992; 70: 149-59.
259. Sunamoto J. Funtionalized liposomes as biocompatible materials // Abstr. Pap: 194 th ACS Nat. Meet. (Amer. Chem. Soc.), New Orleans, La, Aug. 30. – Sept. 4, 1987. – Washington, D.C., 1987. – P.301.
260. Surkova L K, Dyusmikeeva M I., Zalutskaya A M. Гистобактериологические особенности ТБ легких в случаях неэффективности лечения // 34<sup>TH</sup> World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD).-2003.- V. 7. - № 11.-С.312
261. Tan W, Xia N, Cong Y. // Zhonghun Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Zazhi. –1998.-Vol.12, №2.-P.176-178
262. Tanaka T., Matsunaga T. Detection of HbA (Ic) by boronate affinity immunoassay using bacterial magnetic particles // Biosens Bioelectron.- 2001. – P. 1089.
263. Taylor D. The thermal expansion behaviour of the framework silicates // Mineral.Mag. – 1972. - V.38, N297. – P.593-604.
264. Tcherneva E., Rijpens N., Jersek B. et al. Differentiation of Brucella species by random amplified polymorphic DNA analysis //J.- Appl. – Microbiol. – 2000. – Vol. 88 (1).- P. 69-80.
265. Thibert L, Lapierre S. Routine application of high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 1993; 31: 1759-63.
266. Turkova J. Leakage of the coupled affinant // J. Chromatogr. – 1978. - V. 12. - P.189.

267. Van Weemen B.K., Schuurs A.N.W.M. immunoassays using hapten- enzyme conjugates // FEBS Lett.-1972.-Vol 24,N1.-P. 77-81.
268. Waddell RD, Lishimpi K, von Reyn CF, Chintu C, Baboo KS, Kreiswirth B, Talbot EA, Karagas MR. Bacteremia due to *Mycobacterium tuberculosis* or *M. bovis*, Bacille Calmette-Guerin (BCG) among HIV-positive children and adults in Zambia. AIDS 2001; 15: 55-60.
269. Weetall H.H., Detor C.C. Covalent attachmend of proteins to inorganik supports directional activation cyanogen bromide // J. Biotechnol. and Biogen. - 1975. - V.17. - P.295-297.
270. Weimer B.C., Walsh M.K., Beer C. et al. // Appl. And Environ. Microbiol. – 2001. - №3. – P. 1300-1307.
271. Weller T.H., Coons A.H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro // Proc. Soc. Exp. Biol. – 1954. – V.86. – P.789-794.
272. Weston P.D., Devries G.A., Wriggleworth R.. Conjugation of enzyme to immunoglobulins using dimallimids //J. Bioch. Biophys. Acta. - 1980. - V. 612. - P.40-49.
273. WHO Fact Sheet / Tuberculogia // №104.- April, 2000.
274. WHO Geneva/ IUATL Paris. Guidelines for Surveilance of Drug Resistance in Tuberculosis // Int/ J. Tuberc. Lung Dis.- 1998.- Vol.-2.- P. 72-89.
275. Yu B.S., Chol Y.K., Chung H. Development of immunoassay methods by use of liposomes //Biotechnol. Appl. Biochem. – 1987. – V.9, № 3. – P.209-216.
276. Yu H. Comparative studies of magnetic particle-based solid phase fluorogenic and electrochemiluminescent immunoassay // J. Immunol. Methods.- 1998.- V.218 (1-2).- P.1-8.
277. Zerbini E, Cardoso MM, Sequeira MD, Santi MN, Taher H, Larpin D, Latini O, Tonarelli G. Utility of gas chromatography for the identification of mycobacterial species. Medicina (B Aires) 1999; 59: 453-8.