

*На правах рукописи*

**Гаркуша Юлия Юрьевна**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОЗИЦИОННЫХ  
ОРГАНОКРЕМНЕЗЕМНЫХ МАГНОИММУНОСОСОРБЕНТОВ И ИХ  
ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ  
ИНФЕКЦИЙ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2020

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Тюменцева Ирина Степановна**

**Официальные оппоненты:**

**Владимцева Ирина Владимировна** – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный технический университет", кафедра "Промышленная экология и безопасность жизнедеятельности", профессор кафедры

**Девдариани Зураб Леванович** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел информационного обеспечения научных исследований, главный научный сотрудник

**Ведущая организация:**

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук,  
профессор

**Ольга Юрьевна Борисова**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Одной из главных задач в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний и санитарно-эпидемиологическом надзоре является быстрое выявление патогена бактериальной или вирусной природы. Осложнить выполнение этой задачи могут следующие факторы: невысокая концентрация искомого патогена, загрязнение исследуемых образцов различными контаминантами биотической и абиотической природы, необходимость исследования проб большого объема (например, вода открытых природных водоемов или же канализационные стоки). Оптимальным решением этого вопроса явилось применение различных сорбционных материалов, в том числе сорбентов с магнитными свойствами и фиксированными на их поверхности специфическими антителами (магноиммуносорбентов).

Особую нишу среди материалов, используемых для изготовления сорбентов, занимают кремнеземы, которые представляют собой морфологически совершенные жесткие мезопористые каркасные структуры, обладающие химической и микробиологической устойчивостью, значительной адсорбционной ёмкостью, отсутствием токсичности (Брыкалов А.В., 1993; Чуйко А.А., Горлов Ю.И., 1993).

Несмотря на широкое применение сорбционных материалов различной химической природы в медицине, фармакологическом производстве, экологии и др. в Российской Федерации отсутствуют коммерческие препараты на основе магносорбентов для диагностики инфекционных заболеваний, в том числе и особо опасных.

Одним из важных направлений в проведении стандартизации биотехнологических процессов является создание стандартных образцов (СО), предназначенных для воспроизведения единиц величин, характеризующих состав и свойства всех компонентов, значения которых предварительно установлены в результате метрологической аттестации (Бостанова Ф.А., 2009; Борисевич И.В. и др., 2010). Это обеспечит воспроизводимость получаемых результатов исследований и возможность их сравнительной оценки.

После фиксации искомого патогена на аффинном сорбенте и последующей его индикации, например, в иммуноферментном анализе (ИФА), отпадает необходимость использования полистироловых микропланшетов, так как сам магносорбент (МС) выступает в качестве твердой фазы при проведении реакции. При постановке же таких серологических реакций как реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и реакция агглютинации латекса (РАЛ) предварительно нужно провести десорбцию антигена с поверхности сорбента, сохранив его нативные свойства.

### **Степень разработанности темы исследования**

Исследования по применению иммуносорбентов в лабораторной диагностике инфекций проводятся с середины 60-х годов XX века. Широкий диапазон проб и их объемов (от нескольких сот микролитров до многих кубических метров жидкостей), загрязненность исследуемых объектов посторонней микрофлорой диктовали необходимость разработки сорбционных материалов и технологий их применения. В начале их использовали для неспецифической сепарации биологического материала. Затем после разработки методов прочной фиксации на поверхности сорбентов белковых молекул (моноклональных или поликлональных антител, антигенов, ферментов) начали применять так называемые иммуносорбенты для специфической сорбции. При этом для надежного связывания лиганда с целевой молекулой для формирования ковалентных связей включали карбоксильные, эпоксидные, амино- и другие группы, которые активировали в присутствии специфических реагентов (Alexion C. et al., 2006; Тюменцева И.С. и др., 2009).

Многолетние исследования показали значительное преимущество специфической (аффинной) сорбции перед неспецифической. Иммуносорбция дала возможность исследовать сильно загрязненные объекты и проводить индикацию в различных

иммунологических, генетических, бактериологических лабораторных методах (Ефременко В.И., 1996; Потапов В.И. и др., 2012; Тюменцева И.С. и др., 2014).

Для удобства проведения манипуляций с сорбентом разрабатывались методы включения магнитного материала в матрицу. Магнитный компонент обычно заключали внутри микрочастиц, что обуславливало их супермагнетизм, т.е. способность намагничиваться под действием постоянного магнитного поля и быстро и полностью размагничиваться вне его (Peruski A. et. al., 2003). За счет этого микрочастицы не «склеивались» между собой, и это обеспечивало наиболее эффективное узнавание искомого патогена в исходном образце и значительно облегчало дальнейшие манипуляции с ними после сепарации, при этом размер частиц являлся важным фактором, влияющим на кинетику реакции (Olsvik O. et. al., 1994; Gijls M.A., 2007).

Опыт применения магноиммуносорбентов (МИС) в диагностике особо опасных и других инфекций бактериальной и вирусной природы показал их высокую эффективность за счет повышения чувствительности и специфичности лабораторных методов и, как следствие, достоверности результатов (Афанасьев Е.Н., 2000; Жарникова И.В., 2004; Тюменцева И.С. и др., 2009).

Анализ литературы свидетельствует, что довольно успешные экспериментальные разработки по магноиммуносорбентам, продемонстрировавшие перспективность и необходимость этих препаратов, не завершились их промышленным освоением и внедрением в практику. По всей видимости, сложившееся положение связано с существующим широким разнообразием сорбционных материалов, биотехнологических приемов и технологических сложностей приготовления магноиммуносорбентов.

**Цель исследования** – разработка стандартных условий и параметров биотехнологии производства и системы контроля качества композиционных органокремнеземных микрогранулированных магносорбентов, используемых в лабораторной диагностике особо опасных инфекций.

**Задачи исследования:**

1. Определить основные параметры для стандартизации биотехнологических процессов производства магносорбента.
2. Определить контрольные и критические точки производства магносорбента.
3. Разработать стандартный образец Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека композиционного микрогранулированного магносорбента.
4. Разработать технологию элюции антигена туляремийного микроба с магнитной иммобилизованной матрицы и регенерации магноиммуносорбента.

**Научная новизна исследования**

Впервые стандартизован элементный состав микрогранулированного магносорбента на основе алюмосиликата и отработан процесс его производства, определены контрольные и критические точки, что позволяет получать продукт с постоянными заданными свойствами.

На основе разработанной технологии впервые создан стандартный образец композиционного органокремнеземного магносорбента (регистрационный номер 007-9388-2015) с целью унификации производственного выпуска и контроля диагностических препаратов, основанных на аффинной сорбционной технологии (патент РФ на изобретение № 2652231 от 25.04.2018 г.).

Опираясь на технологическую схему изготовления стандартного образца магносорбента, определены основные параметры для иммобилизации специфических иммуноглобулинов на его поверхности для получения аффинного магносорбента (магноиммуносорбента).

Сконструирована магноиммуносорбентная тест-система для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе, которая значительно повышает

специфичность и чувствительность метода, и, как следствие, достоверность получаемых результатов исследования.

Подобрана технология элюирования антигенов с иммобилизованной магнитной матрицы (органокремнеземного магноиммуносорбента), что впервые дало возможность после проведения магнитной сепарации искомого патогена исследовать материал в реакции непрямо́й гемагглютинации и реакции агглютинации латекса (патент РФ на изобретение № 2535070 от 10.12.2014 г.).

Разработана биотехнология производства туляремийного иммунопероксидазного конъюгата и эффективный способ его консервации (патент РФ на изобретение № 2549971 от 10.05.2015 г.), и это позволило получить регистрационные удостоверения Росздравнадзора и наладить коммерческий выпуск препарата.

Созданы технические устройства: «Универсальная укладка для забора и транспортировки материала от людей, животных и из объектов окружающей среды для исследования на особо опасные болезни» (патент РФ на полезную модель № 125976 от 20.03.2013 г.) и «Радиоуправляемая самоходная и плавающая портативная установка для экологического, эпидемиологического и микробиологического мониторинга объектов водной среды» (патент РФ на полезную модель № 133834 от 27.10.2013 г.). В этих устройствах используются специальные «магнитные ловушки» с фиксированным на них аффинным сорбентом, что существенно повышает качество отбора материала для исследования и возможность его взятия в труднодоступных местах заданного или неограниченного объема.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанный алгоритм процессов и параметров биотехнологии производства магноиммуносорбента позволяет получить конечный продукт со стандартными элементным составом, физико-химическими и иммунобиологическими характеристиками.

Создан стандартный образец Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека композиционного микрогранулированного магносорбента (регистрационный № 007-9388-2015), применение которого предусматривается при конструировании и выпуске магноиммуносорбентных тест-систем на основе органокремнеземной матрицы.

Подобран метод элюции антигена с поверхности магнитной иммобилизованной матрицы, который позволяет расширить возможности лабораторной диагностики инфекционных болезней и индикации их возбудителей. Разработанные методы регенерации магноиммуносорбента после проведения элюции позволяют использовать аффинный сорбент многократно, что значительно снижает материальные и трудовые затраты.

Получены регистрационные удостоверения Росздравнадзора, и следующие препараты допущены к обращению на территории Российской Федерации: «Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА)» (по ТУ 9388-010-01 897080-2009, № ФСР 2010/06744 от 26.12.2012 г.); «Набор реагентов тест-система иммуноферментная магноиммуносорбентная для выявления возбудителя туляремии» (по ТУ 9388-006-01897080-2012, № ФЗН 2013/429 от 04.04.2013 г.).

Составлена нормативная документация, включающая программу разработки, инструкцию по применению и свидетельство на стандартный образец магносорбента, одобренная Ученым советом и утвержденная директором института (протокол № 5 от 18.06.2015 г.). Стандартный образец магносорбента зарегистрирован в реестре стандартных образцов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, регистрационный номер 007-9388-2015.

На Ученом Совете Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека утверждена нормативная документация: технические условия (ТУ) 9388-039-01897080-2013 и пусковой регламент (ПУР) № 01897080-28-13 на «Набор реагентов магноиммуносорбент туляремийный с элюирующим буфером» (протокол № 8 от 03.09.2013 г.).

#### **Методология и методы исследования**

В соответствии с целью и задачами диссертационной работы методология исследования заключалась в разработке условий и параметров биотехнологии получения композиционных органокремнеземных микрогранулированных магносорбентов с заданными свойствами. Предметом исследования явился элементный состав микрогранулированного магносорбента на основе алюмосиликата, объектом – стандартный образец предприятия композиционных органокремнеземных магносорбентов, используемых в лабораторной диагностике особо опасных и других инфекций. Эксперименты на животных были выполнены с соблюдением требований СП 1.3.2322-08 по безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и СП 1.3.3118-13 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)" и гуманных методов работы с животными в соответствии и Директивой Европейского совета, согласно Протоколу Локального этического комитета при Федеральном казенном учреждении здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 30.12.2016 года.

#### Штаммы микроорганизмов, использованные в опытах

В работе использовали 29 штаммов микроорганизмов II, III, IV групп патогенности: *Francisella (F.) tularensis*, *Brucella (B. abortus, B. melitensis, B. suis)*, *Yersinia (Y.) enterocolitica*, *Salmonella (S.) typhimurium*, *Escherihia (E.) coli*.

#### Полевой материал

При выполнении работы использован полевой материал, собранный в семи районах Ставропольского края: 1519 экземпляров клещей. Сбор клещей проводили во время экспедиционных выездов сотрудников лаборатории диагностики природно-очаговых инфекций, лабораторий медицинской зоологии и медицинской паразитологии Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

#### Лабораторные животные, использованные в экспериментах

В экспериментальной работе использовались лабораторные животные – кролики породы «Шиншилла», в количестве 50 особей.

#### Микробиологические методы исследования

Штаммы *F. tularensis* Miura, Schu, 83 erys, 325/1765, 543/6, 503/840, 122, 319/38, 144/713, 15 НИИЭГ (ЖТВ) культивировали при температуре 37<sup>0</sup>С на плотной питательной среде Ft-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Стерилизацию бактериальных масс *F. tularensis* осуществляли двойным объемом холодного ацетона (минус 40<sup>0</sup>С) в течение 24 ч по методу Василенко Н.Ф. (1991).

Гетерологичные штаммы микроорганизмов (*Y. enterocolitica* 64, 178, 383(9), 124, *B. melitensis* 16-M, 14, 93, Rev-1, *B. abortus* 544, 272, 19 BA, *B. suis* 1330, 461, 61, *E. coli* SA-11, 113-3, *Salmonella typhimurium* 7407, 9640) выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2), агаре Альбими (рН 7,2). Обеззараживание культур микроорганизмов производили путем кипячения бактериальных масс 20 минут с последующим добавлением фенола до 1% концентрации и экспозиции в течение 24 ч при температуре (22±4)<sup>0</sup>С (Онищенко, 2006).

### Иммунологические методы исследования

Иммунизацию животных проводили с применением иммунокорректоров тималина и циклофосфана. Контроль титра специфических антител (Ат) в сыворотках определяли в непрямой реакции иммунофлуоресценции (НРИФ) по Т.Н. Weller, А.Н. Coons (1954). Для осаждения белков использовали метод фракционирования белковых смесей высокомолекулярным, незаряженным, линейным полимером – полиэтиленгликолем (ПЭГ – 6000) по А. Polson, G.M. Potgieter, J.E. Largier (1964). Специфическую активность Аг микроорганизмов и полученных иммунных сывороток определяли в реакции иммунодиффузии (РИД) в 1 % агаровом геле (Difco, USA) по О. Ouchterlony (1949).

### Физико-химические методы исследования

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли по Н. Maurer (1971). Электрофоретическую подвижность (Rf) рассчитывали по формуле, предложенной К. Weber и М. Osborn (1969).

Антигены (Аг) микроорганизмов изолировали водно-солевой экстракцией с последующей ультразвуковой дезинтеграцией микробных клеток. Дезинтегрирование осуществляли на аппарате УЗДН-2Т (Россия).

### Иммунохимические методы исследования

Иммунопероксидазные конъюгаты (КПХ) получали методом перйодатного окисления по R.K. Nakane, А. Kawaoi (1977) в модификации М.В. Wilson, R.K. Nakane (1978). Рабочий титр и специфическую активность КПХ определяли по методике М. Clark, А. Adams (1977) в «сэндвич»-варианте ИФА.

### Материалы для синтеза композиционных органокремнеземных магнитоиммосорбентов (МИС) и физико-химические методы их исследования

Для получения МС и МИС в качестве основной матрицы использовали алюмосиликат (ТУ 6-09-01-356-76), модификаторами сорбента служили декстран (полиглюкин) и вторичный алкилсульфат натрия, в качестве магнитного материала использовали оксид железа (ГОСТ4173-77). Удельную поверхность МС определяли по методу А.А. Клячко-Гурвича (1961), основанному на низкотемпературной адсорбции азота. Суммарный объем и радиус пор определен по методу Н.В. Кельцева (1984).

### Биофизические методы исследования

Микроструктуру сорбента исследовали на сканирующем электронном микроскопе IMZ-T 3000 (Япония). Истинную форму и размер частиц МС исследовали атомно-силовой микроскопией на сканирующем зондовом микроскопе SPM-9600 («Shimadzu», Япония).

Сублимацию биопрепаратов проводили в сушилке лиофильной камерного типа ЛС-500 (Россия).

Количественное определение белка проводили по методу О. Warburg и W. Christian (1941) сравнением поглощения белков при 280 и 260 нм на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония).

### Методы математической и статистической обработки материала

Математическую обработку результатов экспериментов осуществляли на компьютере (программа EXCEL). Для подтверждения достоверности результатов, полученных при исследовании, применяли статистические методы (Тамбовцев Е.П., Ахметкалиев С.Г., Пятницкий, 1969; Скутч Д., Уэст Д., 1979).

### **Личное участие автора в получении результатов**

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации, осуществлялось на всех этапах работы и выразилось в анализе и обобщении литературных данных, выполнении всего объема микробиологических, физико-химических, иммунологических, иммунохимических, биофизических исследований. Автор лично провела статистическую обработку и анализ полученных данных, проанализировала полученные результаты, сформулировала выводы и практические рекомендации.

Помощь в получении и исследовании полевого материала оказывали: заведующий лабораторией природно-очаговых инфекций ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.б.н. Котенев Е.С., сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, биолог Гнусарева О.А. При проведении генетических исследований – заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.х.н. Ковалев Д.А. Удельную поверхность магносорбента, суммарный объем и радиус пор, количественную оценку магнитных свойств магносорбента проводили при содействии сотрудников Северо-Кавказского федерального университета на базе кафедры технологии наноматериалов Инженерного института: д.т.н., профессора Серова А.В., старшего преподавателя кафедры Блинова А.В.

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

1. Разработанные условия и параметры биотехнологии получения композиционных органокремнеземных микрогранулированных магносорбентов позволяют осуществлять производство стандартизованных магноиммуносорбентов с заданными свойствами.
2. Предложенная технология элюирования иммобилизованных антигенов с поверхности органокремнеземного магноиммуносорбента дает возможность применять для детекции искомого патогена такие серологические методы как реакция непрямой гемагглютинации и реакция агглютинации латекса, способ регенерации магноиммуносорбентов после проведенной элюции сохраняет его иммунобиологические свойства для многократного использования.
3. Эффективность применения разработанных туляремийных медицинских иммунобиологических препаратов и технических устройств для работы с магноиммуносорбентами подтверждена многочисленными лабораторными и полевыми испытаниями, свидетельствующими о повышении аналитической чувствительности детекции возбудителей особо опасных инфекций в иммуноферментном анализе, не менее чем –  $1 \times 10^2$  м.к./мл.

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

О достоверности результатов работы свидетельствует использование современных методов исследования, которые характеризуются высокой чувствительностью, объективностью, соответствуют поставленным в работе цели и задачам. Использование указанных методов позволило впервые разработать стандартный образец композиционного органокремнеземного магносорбента, на его основе сконструировать тест-систему иммуноферментную магноиммуносорбентную, позволяющую повысить специфичность и чувствительность иммуноферментного анализа до 10 м.к./мл и наладить ее коммерческий выпуск.

Апробация диссертационной работы состоялась на расширенном заседании научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 1 от 15.05.2019 г.).

Основные разделы диссертационной работы выполнены на базе научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках двух научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ: «Разработка стандартного образца

предприятия (СО) магносорбента» (№ ГР 01201456169) и «Разработка магноиммуносорбента туляремийного с элюирующими растворами для серологических и генетических исследований» (№ ГР 01201169579) совместно с д.м.н., профессором Афанасьевым Е.Н., д.б.н. Жарниковой И.В., к.б.н. Ждановой Е.В., к.б.н. Старцевой О.Л.

Материалы диссертации обсуждены, доложены и опубликованы в материалах научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора (25-27 мая 2010 г., г. Оболенск, Московская область); Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы военной медицины, обитаемости и профессионального отбора» (17-18 ноября 2011 г., г. Санкт-Петербург); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (23-24 мая 2012 г., г. Ставрополь); XI Международной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (16-17 октября 2012 г., г. Саратов); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора «Актуальные проблемы профилактической медицины, среды обитания и здоровья населения» (2013 г., г. Уфа); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.К. Блохиной Роспотребнадзора (28 мая 2014 г., г. Нижний Новгород); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь).

#### **Публикации**

Основное содержание диссертации отражено в 25 научных работах, в том числе 5 публикаций в рецензируемых изданиях, 3 публикации в других изданиях, 5 патентов РФ на изобретения, 12 публикаций в материалах конференций.

#### **Структура и объем диссертации**

Основной текст диссертации изложен на 197 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований с обсуждением полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 237 работ, из них 178 – отечественных и 59 – зарубежных авторов, приложений. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 37 рисунками.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

#### **Разработка стандартных условий биотехнологии производства и системы контроля качества магноиммуносорбента**

С целью стандартизации магноиммуносорбентных диагностических препаратов и налаживания их производственного выпуска нами проведена разработка стандартных условий синтеза и стандартного образца (СО) композиционного органокремнеземного микрогранулированного МС.

Синтез МС с высокой сорбционной активностью осуществлен методом формирования пористой структуры в присутствии органического полимера в соответствии с принципами, сформулированными в работах В.И. Ефременко (1996), И.С. Тюменцевой (1996), И.В. Жарниковой (2004).

Основной матрицей при получении МС служил алюминий кремнекислый мета (алюмосиликат). Алюмосиликат – мелкодисперсный порошок белого цвета, представляющий собой комплексное соединение алюминия и кремния с избыточным отрицательным зарядом. Для него характерна высокая реакционная способность поверхностных групп при взаимодействии со многими соединениями.

В качестве магнитного компонента использован оксид железа (II), представляющий собой мелкокристаллическое соединение черного цвета, с выраженными магнитными

свойствами, нерастворимое в воде. Оксиды железа нейтральны при связывании с биологически активными компонентами или клеточными структурами и не влияют на их свойства.

Модифицирование поверхности сорбента осуществляли 6 %-ным коллоидным раствором декстрана (полиглюкина) с молекулярной массой  $60000 \pm 10000$  в 0,9 %-ном растворе натрия хлорида.

Для получения частиц контролируемого размера измельчение МС проводили на шаровой планетарной микромельнице Fritsch P-7 (Германия) методом сухого размола.

Для определения влияния степени заполнения размольного стакана материалом, а также количества и диаметра мелющих тел на эффективность измельчения была осуществлена серия экспериментальных помолов. В работе использовали размольные стаканы объемом 45 мл, мелющие шары из диоксида циркония диаметром 5 и 10 мм в количестве от 5 до 15 шт. Количество загружаемого магносорбента варьировало от 1 до 10 г. Скорость вращения планетарного диска при измельчении оксидов металлов составляла 450 об/мин (величина постоянная).

Экспериментальные пробные помолы показали, что с увеличением числа шаров с минимальным диаметром резко сокращалось время размола с образованием частиц МС высокой дисперсности. По мере увеличения степени заполнения размольного стакана материалом наблюдалось снижение эффективности процесса помола, выражающееся в неоднородности фракций. Максимальная эффективность процесса размола достигалась при использовании шаров диаметром 10 мм в количестве 10 шт. и массой загружаемого МС – 3 г.

В результате проведенных экспериментов рекомендованы следующие оптимальные условия измельчения МС: объем размольного стакана – 45 мл, диаметр мелющих шаров – 10 мм, количество мелющих шаров – 10 шт., количество загружаемой пробы – 3 г, скорость вращения – 450 об/мин.

Магносорбенты, исследованные в биологическом микроскопе при увеличении  $\times 40$ , представляли собой высокодисперсные микрогранулы неправильной формы с выраженными магнитными свойствами, обладающие хорошей смачиваемостью и эффективным оседанием в растворе. В своей структуре частицы содержали оксид железа (II), расположенный в объеме алюмосиликатной матрицы (Рисунок 1). Дендритная форма (Рисунок 1а) образовывалась вследствие скопления нескольких частиц.

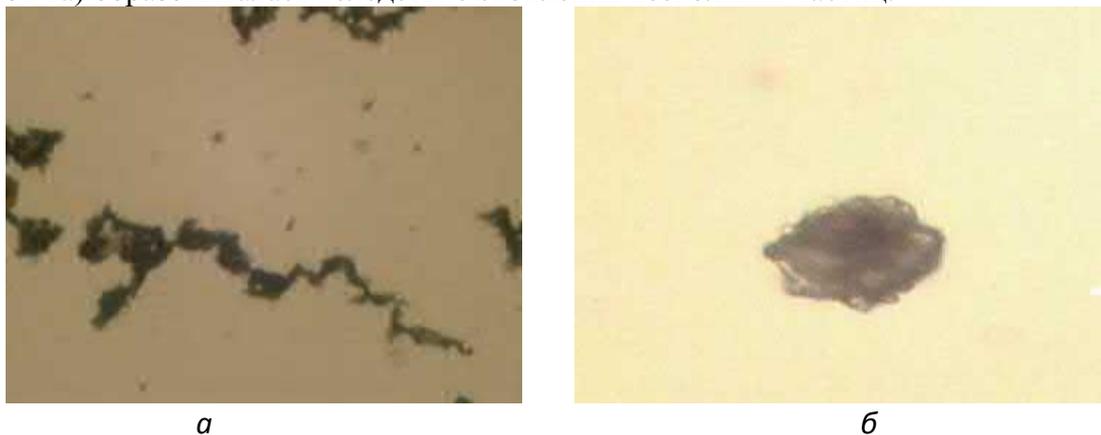


Рисунок 1 – Микроскопия магносорбента: а – общий вид, б – отдельная частица (Увеличение  $\times 40$ ) (Meiji Techno MT 6000», Япония)

Вопрос о том, являются ли частицы сорбента сферической формы предпочтительными по сравнению с частицами неправильной формы и обеспечивают ли они получение каких-либо особых преимуществ, обсуждался многими исследователями, однако никаких убедительных доказательств большей стабильности, эффективности, проницаемости и других свойств микросферических сорбентов предоставлено не было.

Дальнейшие исследования были направлены на изучение влияния времени измельчения на эффективность процесса. Измельчение образцов МС проводили в течение 1, 2, 3, 4, 5 мин при указанном соотношении массы измельчаемого материала и количества шаров. Распределение частиц по размерам представлены на рисунке 2.



Рисунок 2 – Распределение МС по размерам, полученным при измельчении МС в течение 1-5 мин

Размер частиц МС после 1 мин обработки составил ( $6,8 \pm 0,5$ ) мкм и снижался с увеличением времени измельчения. Через 2 мин измельчения данный показатель снизился до ( $4,8 \pm 0,5$ ) мкм, а через 3 мин составил ( $3,8 \pm 0,5$ ) мкм. С дальнейшим увеличением времени обработки размер частиц изменялся незначительно и находился в пределах ( $3,0 \pm 0,3$ ) мкм после 4-х минут измельчения; размол в течение 5 мин приводил к образованию мелкой фракции частиц с минимальным размером ( $2,5 \pm 0,3$ ) мкм.

Использование атомной силовой микроскопии (АСМ) на сканирующем зондовом микроскопе SPM-9600 («Shimadzu», Япония) в исследовании МС позволило установить истинную форму и размеры частиц (Рисунок 3). По внешнему виду и размерам все образцы МС были однородны и соответствовали предъявляемым требованиям.

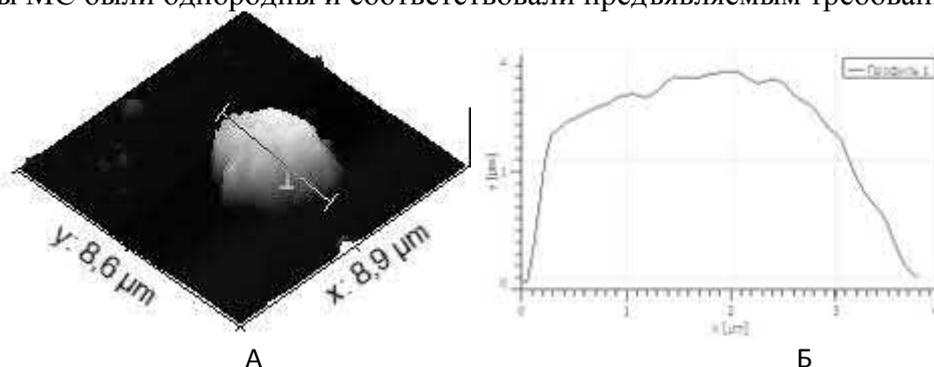


Рисунок 3 – АСМ-изображения частицы, полученной после трехминутного измельчения: А – топография частицы, Б – профиль частицы

*Примечание:* плоскость сечения на рисунке 3(А), изображение получено с использованием программы Gwyddion на сканирующем зондовом микроскопе SPM-9600 («Shimadzu», Япония)

Основным показателем, характеризующим эффективность сорбентов, является их адсорбционная емкость, поэтому окончательное решение по выбору оптимального времени измельчения можно было сделать только после изучения их адсорбционных свойств.

Химическое активирование поверхности полученных после измельчения образцов МС проводили двумя равнозначными вариантами модифицирования твердофазных носителей: окислением перйодатом натрия и воздействием поверхностно-активным веществом (ПАВ) – вторичным алкилсульфатом натрия.

В результате окислительных процессов под действием натрия перйодата на поверхности МС образуются альдегидные группы, способные взаимодействовать с аминоклуппами белкового лиганда. ПАВ, растворяясь в воде, образуют мицеллы, которые благодаря гидрофобности связывают мономерные формы поверхностных белков. При этом образуются структуры, напоминающие пчелиные соты.

После активирования поверхности МС добавляли белковый лиганд (IgG против возбудителя туляремии) с концентрацией ( $2,5 \pm 0,5$ ) мг/мл. Взвесь инкубировали в течение 2 ч при температуре 20-25 °С, периодически перемешивая, отстаивали, надосадов фильтровали.

Проводили измерение концентрации белка, иммобилизованного на поверхности МС, и рассчитывали его количество. На всех этапах отделение МС от жидкости проводили методом седиментации в поле постоянного магнита. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность иммобилизации IgG на поверхности магносорбентов

Время измельчения магносорбента, мин	Количество связавшихся IgG, мг/мл	
	магносорбент, активированный ПАВ	магносорбент, активированный перйодатом натрия
1	$0,84 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,1$
2	$0,70 \pm 0,2$	$0,91 \pm 0,1$
3	$0,90 \pm 0,2$	$1,00 \pm 0,2$
4	$0,89 \pm 0,1$	$0,90 \pm 0,2$
5	$0,59 \pm 0,2$	$0,83 \pm 0,1$

Данные таблицы свидетельствуют, что время измельчения и размер частиц оказывали существенное влияние на адсорбционную емкость МС. Наибольшее количество связавшихся IgG наблюдалось в образцах, активированных перйодатом натрия и измельченных в течение 3 мин, и составляло ( $1,00 \pm 0,2$ ) мг/мл. Трехминутный временной интервал измельчения способствовал адсорбции ( $09,0 \pm 0,2$ ) мг/мл IgG в группе магносорбентов, активированных ПАВ.

С увеличением времени измельчения и уменьшением размера частиц наблюдалось снижение адсорбционной активности во всех образцах МС, независимо от способа активирования их поверхности. Кроме того, измельчение в течение 5 мин МС крайне неудобны в использовании: при взвешивании занимают значительный объем, пылят при работе, образуют достаточно стабильную взвесь в водной суспензии, что значительно увеличивает время седиментации. В результате этого на этапе отмывки неизбежны потери, что ведет к снижению общей концентрации частиц в суспензии и дальнейшему перерасчету вносимых компонентов.

Очевидно, что наилучшими адсорбционными свойствами обладали образцы магносорбентов, измельченные в течение 3 мин с размерами частиц ( $3,8 \pm 0,5$ ) мкм. Активированные перйодатом натрия частицы адсорбировали ( $1,00 \pm 0,2$ ) мг/мл IgG при соблюдении указанных условий иммобилизации.

Используя полученные данные, в технологической схеме производства СО МС можно выделить следующие основные стадии: гидратация компонентов; термообработка гидрогеля при 100-110 °С в течение 30 мин; механическое измельчение МС; химическое активирование поверхности МС. Порядок разработки стандартных образцов

предусматривает заключительную стадию производства, включающую фасовку конечного продукта (МС), этикетировку (маркировку), упаковку, в которую вкладывают инструкцию по применению.

Установление последовательности технологических операций с оптимальными условиями синтеза позволило выделить процессы, в которых необходимо проводить контрольные измерения, т.е. установить контрольные точки. Для операции «гидратация компонентов» контрольными точками являются температура и время проведения процесса. Для операции «механическое измельчение МС» – скорость вращения планетарного диска и время измельчения продукта. Операция «химическое активирование поверхности МС» требует точности количественного соотношения компонентов с соблюдением температурного и временного режимов. На стадии «фасовка, упаковка и маркировка готового продукта» контролируют правильность заполнения этикеток и маркировку внешней упаковки.

Технологическая схема производства СО МС представлена на рисунке 4.

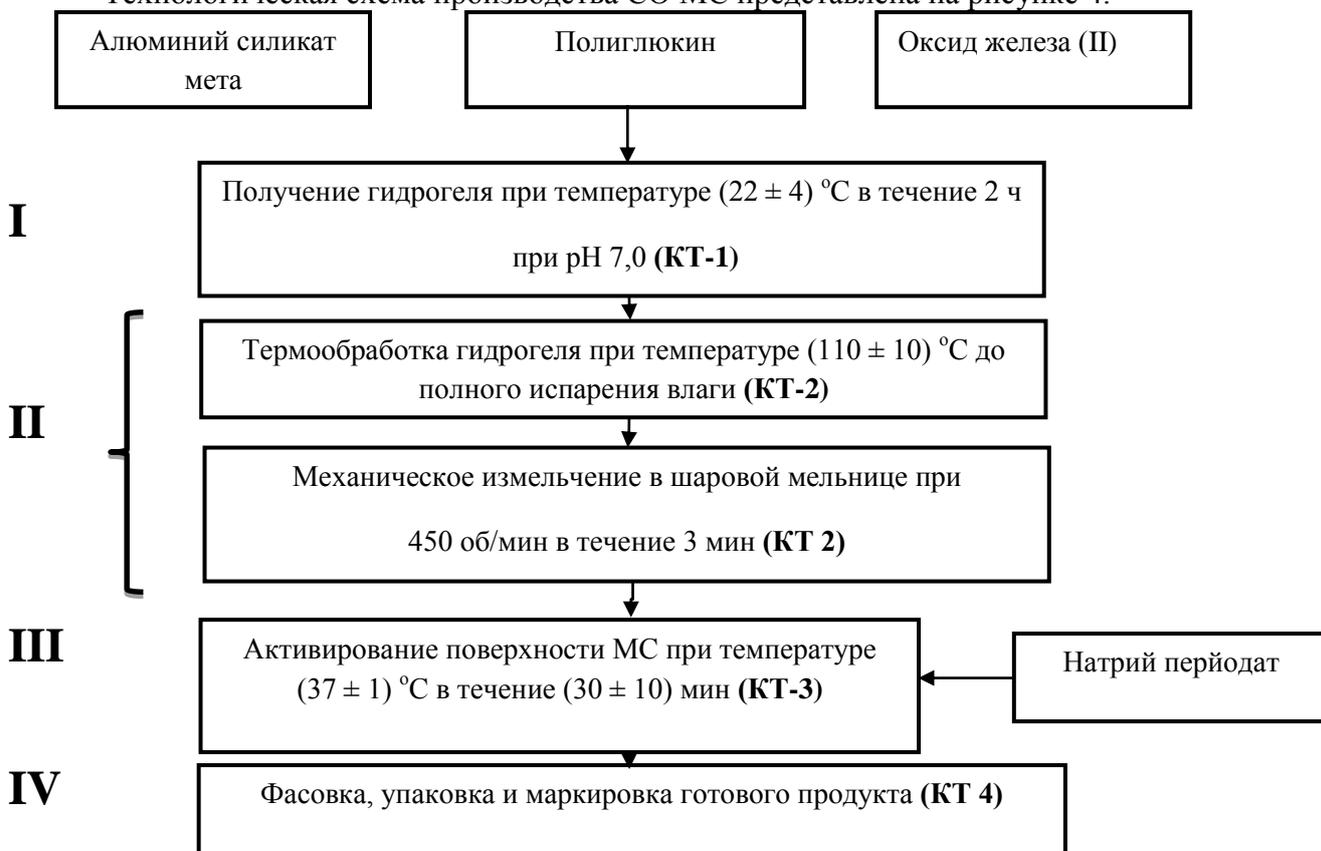


Рисунок 4 – Технологическая схема получения стандартного образца магносорбента

*Примечание:* КТ-1 – КТ-4 – контрольные точки производства

При исследовании стабильности основных показателей качества СО МС в процессе хранения методом ускоренного теста образцы выдерживали в термостате при температуре  $(58 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 14 и 21 суток. Параллельно проводили исследования долговременной стабильности, выдерживая образцы при температуре  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  и  $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$  в течение 6, 12 и 18 мес.

Установлено, что образцы СО МС при температурах хранения  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  и  $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$  были стабильны без изменения внешнего вида, pH и адсорбционной активности в течение 6, 12 и 18 месяцев (срок наблюдения). Более высокая температура хранения образцов  $(58 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 14 и 21 суток не влияла на показатели pH и адсорбционной активности. Однако наблюдалось изменение цветности надосадочной жидкости в образцах после 21 суток хранения при указанной температуре, не оказывающее существенного влияния на основные аттестуемые характеристики испытываемых серий СО МС.

Результаты проведенных исследований позволили рекомендовать гарантийный срок хранения СО МС – 3 года.

Проведены межлабораторные испытания СО МС по следующим показателям: внешний вид, pH, размер частиц, адсорбционная активность. Они показали, что все экспериментально-производственные серии СО МС соответствовали требованиям (аттестованным значениям) на стандартный образец предприятия, что позволило зарегистрировать СО МС в реестре стандартных образцов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (регистрационный номер 007-9388-2015).

#### **Применение МИС в лабораторной диагностике особо опасных инфекций (на примере туляремии)**

Используя технологическую схему производства СО МС, мы изготовили иммуноглобулиновый магноиммуносорбент для избирательного концентрирования возбудителя туляремии в объектах окружающей среды и его выявления в иммуноферментном анализе.

Туляремия – природно-очаговая особо опасная инфекция, возбудитель которой, циркулируя в природных очагах, может вызвать значительные вспышки этого заболевания. Существует постоянная эпидемиологическая угроза природного очага туляремии степного типа на территории Ставропольского края (СК). Из 26 административных территорий СК 18 находятся на энзоотичной территории. В разные годы здесь регистрировались эпизоотии (выделение штаммов) различной интенсивности. За период 2003 – 2015 гг. в СК было зарегистрировано 49 больных туляремией (Зайцев А.А., Гнусарева О.А. и др., 2017). В связи со сказанным, лабораторная диагностика туляремии имеет важнейшее значение в комплексе противоэпидемических мероприятий. При ее проведении возникают трудности в обработке проб из объектов окружающей среды, так как в этих случаях необходимо избавиться от посторонних примесей и максимально сконцентрировать искомый патоген. Очевидно, что использование магнитной сепарации для этих целей будет несомненно эффективно.

Для конструирования туляремийного МИС нам удалось получить высококачественный антигенный и антительный биологический материал.

Сравнительное изучение методом диск-электрофореза в ПААГ антигенной структуры водорастворимых комплексов семи штаммов *F. tularensis*, относящихся к разным подвидам, дало возможность выбрать три штамма: *F.tularensis* 543/6 (*mediasiatica*), *F.tularensis* Schu (*nearctica*) и *F.tularensis* 503/840 (*holarctica*), из которых изолирован полигрупповой водорастворимый антиген. Для извлечения наиболее полного антигенного комплекса из микробов с сохранением нативности биополимеров мы избрали способ, разработанный Н.Ф. Василенко с соавт. (1988), в нашей модификации (Рисунок 5).

Для получения МИС проводили иммобилизацию МС специфическим лигандом, которым служили поликлональные иммуноглобулины класса G из туляремийной адсорбированной сыворотки, выделенные ПЭГ-6000.

Иммобилизованные МС были использованы в модифицированном методе иммуноферментного анализа. При разработке иммунопероксидазных конъюгатов (КПХ) применяли высокоэффективные IgG, выделяемые из туляремийных гипериммунных сывороток с помощью ПЭГ-6000. Рабочий титр КПХ составил 1:400-1:800, чувствительность –  $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  м.к./мл. Все серии полученных конъюгатов для ИФА дали отрицательные результаты с гетерологичными штаммами, что свидетельствовало об их специфичности. Названные конъюгаты входят в «Набор реагентов тест-системы диагностической для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА)», который зарегистрирован в Росздравнадзоре (№ ФСР 2010/06744).

Полученный иммуносорбент использован для проведения иммуномагнитной сепарации возбудителя туляремии и детекции его в иммуноферментном анализе, при этом в качестве твердой фазы вместо полистироловых микропланшет применяли

разработанный нами магнитоуправляемый аффинный сорбент при постановке «сэндвич»-варианта этого метода

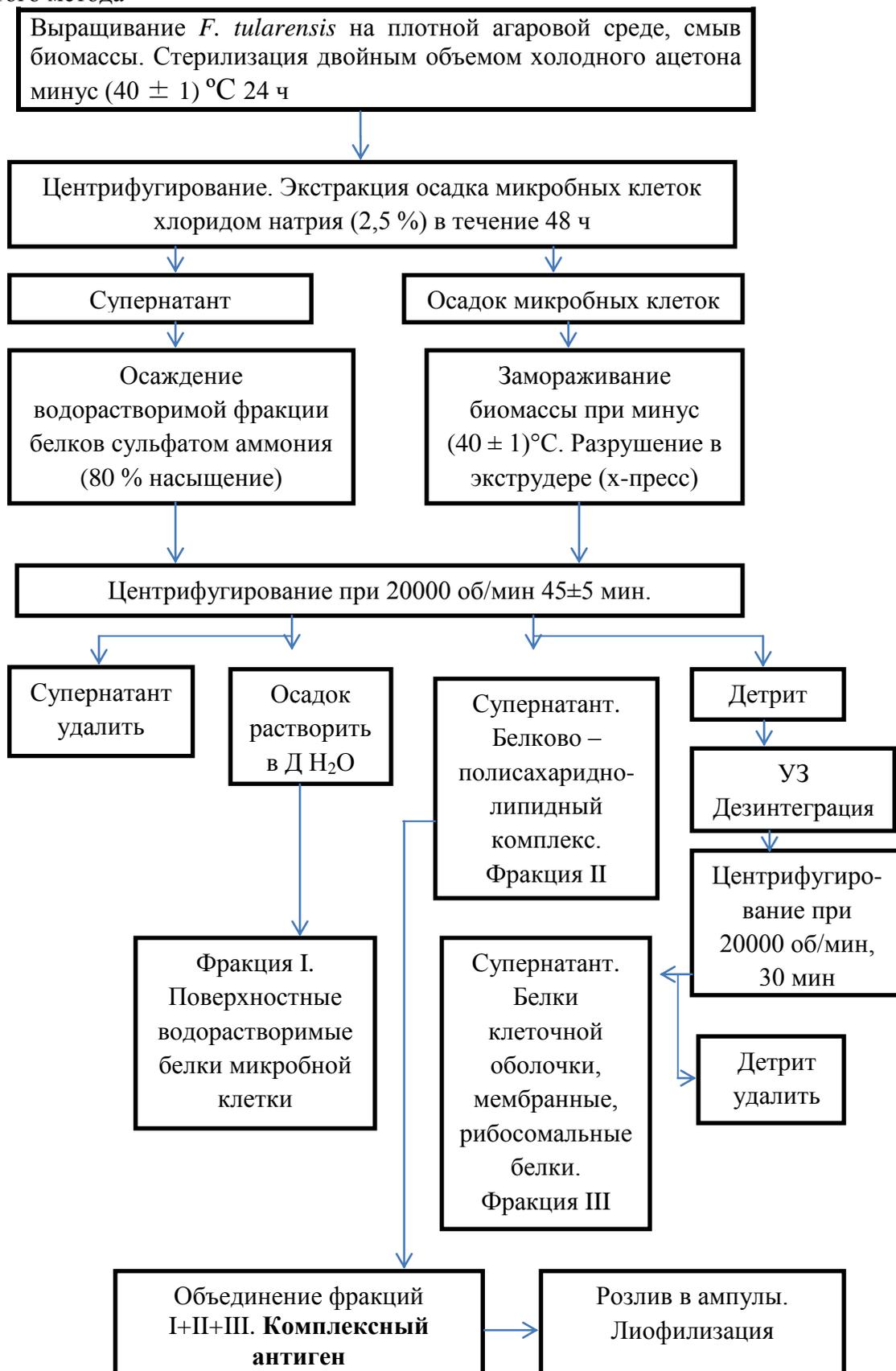


Рисунок 5 – Биотехнологическая схема получения водорастворимых антигенных комплексов *F. tularensis*

При постановке сочетанного метода МИС+ИФА искомый патоген, содержащийся в исследуемом материале, специфически взаимодействовал с IgG против антигенов *F. tularensis*, иммобилизованными на МИС. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляли с помощью «Набора реагентов тест-системы диагностической для выявления возбудителя туляремии в ИФА».

При проведении ИФА с помощью МИС туляремиальные микробы обнаруживались в концентрации, эквивалентной по ОСО 42-28-85П,  $1,0 \times 10^2$ - $1,0 \times 10^3$  м.к./мл. Все изготовленные серии МИС не выявляли в ИФА гетерологичные штаммы микроорганизмов в концентрации, эквивалентной по ОСО 42-28-85П,  $1,0 \times 10^5$  м.к./мл и выше. Время постановки ИФА с применением МИС составило 50-60 мин, а традиционным методом, учитывая 18-ти часовую сенсибилизацию микропланшет – 20-21 ч. При этом значительно увеличился срок хранения сенсибилизированной твердой фазы (с 10 дней до двух лет и более), чувствительность модифицированного ИФА повышалась на два-три порядка по сравнению с общепринятым ИФА.

Применение МИС позволяет на этапе подготовки пробы путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освобождаться от всевозможных примесей, тем самым, исключая их отрицательное влияние на реакцию, максимально концентрируя искомый патоген, что повышает специфичность и чувствительность методов экспресс-анализа, а также достоверность как положительных, так и отрицательных результатов.

Разработанный нами туляремиальный МИС входит в «Набор тест-системы диагностической магноимносорбентной для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе», на который получено регистрационное удостоверение № ФЗН 2013/429, а также сертификат соответствия Федерального Агентства по техническому регулированию и метрологии № 1405362, препарат допущен к обращению на территории РФ и используется лабораторной службой Роспотребнадзора. Диагностическую ценность названной тест-системы подтвердили полевые испытания при исследовании иксодовых клещей, собранных на территории Ставропольского края (Таблица 2).

Таблица 2 – Исследование иксодовых клещей, собранных в административных районах Ставропольского края, на наличие антигена туляремии

№	Вид клеща	Количество клещей, абс.	Количество пулов, абс.	Количество положительных пулов			
				ИФА		МИС+ИФА	
				абс.	%	абс.	%
1	<i>Boophilus annulatus</i>	136	6	0	0	0	0
2	<i>Dermacentor marginatus</i>	553	96	4	4,2	11	11,5
3	<i>Dermacentor reticulatus</i>	26	4	0	0	0	0
4	<i>Haemaphysalis punctata</i>	42	11	0	0	1	9,1
5	<i>Hyalomma marginatum</i>	257	65	0	0	8	12,3
6	<i>Hyalomma scupense</i>	54	37	0	0	1	2,7
7	<i>Ixodes ricinus</i>	407	50	0	0	3	6,0
8	<i>Rhipicephalus rossicus</i>	44	7	0	0	1	14,3
9	Всего	1519	276	4	1,4	25	9,1

Согласно МУ 3.1 2007 – 05 «Профилактика инфекционных болезней: Эпидемиологический надзор за туляремией», при исследовании воды из различных водоемов предусмотрен разовый отбор проб ограниченного объема (100 – 200 мл). При этом возбудитель туляремии не обязательно присутствует в данном месте и в данное время в момент забора пробы воды, в силу того, что он туда поступает дискретно. Кроме того, многократное разбавление материала, содержащего патогенную микрофлору, при попадании в проточные водоемы приводит зачастую к снижению концентрации возбудителя инфекции ниже минимальной дозы, не позволяющей обнаружить его традиционными индикационными методами анализа. В совокупности эти факторы могут привести к получению недостоверных данных, искажающих эффективность мероприятий эпидемиологического надзора. Для их нивелирования нами разработаны технические устройства для забора проб из объектов окружающей среды с применением МИС, новизна которых подтверждена патентами РФ № 125976 от 20.03.2013 г., № 133834 от 27.10.2013 г.

#### **Отработка технологий элюции антигена с поверхности магнитной иммобилизованной матрицы и регенерации МИС**

При постановке «сэндвич»-варианта ИФА+МИС последние сами выступают в качестве твердой фазы, при этом нет необходимости в сенсibilизированных полистироловых микропланшетах, традиционно используемых при проведении ИФА. Для постановки таких серологических реакций как РНГА и РАЛ после проведения избирательного концентрирования патогена на МИС целесообразно проводить его десорбцию с магнитной иммунной матрицы, используя элюирующие растворы.

Для элюции использовали различные ферменты, детергенты, кислоты, щелочи, буферные растворы и ряд других реагентов.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что для постановки серологических реакций после селективного концентрирования возбудителя туляремии с помощью МИС целесообразно проводить элюирование патогена с магнитной иммунной матрицы, используя один из растворов: 1 % раствор пепсина, рН 4,0; 2 % раствор твин 20, рН 5,6; 0,03 М раствор калия едкого, рН 11,4; 60 % раствор ацетонитрила, рН 8,5; ТРИС-ЭДТА буфер, рН 8,9; 0,1 М трис-(оксиметил)-аминометан, рН 9,7.

При применении этих элюентов наблюдалась наиболее эффективная десорбция антигенов с поверхности магнитоуправляемых микроразмерных частиц, отсутствовали ложноположительные реакции в РНГА, РАЛ. Наиболее активным реагентом явился 0,03 М раствор калия едкого: чувствительность серологических реакций при его использовании составила  $2,5 \times 10^5$  м.к./мл, в то время как у остальных –  $1 \times 10^6$ - $1,25 \times 10^6$  м.к./мл, что в 4 раза превышало данный показатель. Названные элюирующие растворы после промывки МИС позволяли использовать его многократно (Таблица 3).

Таблица 3 – Показатели элюции антигена туляремийного микроба после инкубации с МИС

Элюент	рН	Ложноположительные результаты	Чувствит. в РНГА, м.к./мл, после элюции	Чувствит. в РАЛ, м.к./мл, после элюции	Воспроизводительность	Возможность многократного использования	Воспроизводительность
1 % пепсин	4,0	нет	$1,25 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6$	85 %	да	87 %
2 % раствор Твин 20	5,6	нет	$1,25 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	89 %	да	90 %
0,03 М раствор КОН	11,4	нет	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	95 %	да	95 %
60 % ацетонитрил	8,5	нет	$1,0 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	93 %	да	91 %

Продолжение таблицы 3

ТРИС-ЭДТА буфер	8,9	нет	$1,25 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	90 %	да	92 %
0,1 М трис- (оксиметил) аминометан	9,7	нет	$1,25 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6$	94 %	да	94 %

Таким образом, в результате проведённых исследований разработан способ элюции возбудителя туляремии с МИС, позволяющий не только качественно элюировать антиген с магнитной иммобилизованной матрицы для последующего исследования в РНГА и РАЛ, но и сохранить антитела на магнитной матрице для многократного использования с целью селективного концентрирования возбудителя из объектов окружающей среды, позволяя экономить трудовые и материальные затраты.

Исследования позволили сконструировать «Набор реагентов магноиммосорбент туляремиальный с элюирующим буфером». Межлабораторные испытания набора реагентов по оценке внешнего вида, растворимости, герметизации, определения чувствительности при исследовании гомологичных штаммов в РНГА после проведения элюции селективно сконцентрированного на МИС антигена показали соответствие параметрам качества и требованиям, заложенным в ТУ 9388-039-01897080 – 2013, и подтвердили его диагностическую эффективность.

### ВЫВОДЫ

1. Определены основные параметры биотехнологических процессов производства композиционного органокремнеземного магносорбента, позволяющие получать конечный продукт со стандартными элементным составом и физико-химическими характеристиками, и это способствовало разработке стандартного образца композиционного магносорбента.
2. На основе стандартного образца магносорбента и поликлональных туляремиальных иммуноглобулинов класса G сконструирован магноиммосорбент, который продемонстрировал при проведении многочисленных лабораторных и полевых испытаний высокую диагностическую ценность, возможность исследования сильно загрязненного материала неограниченного объема при выявлении *F. tularensis* в объектах окружающей среды.
3. Разработана технология изготовления туляремиальных иммунопероксидазных конъюгатов для выявления *F. tularensis*.
4. Сконструирован «Набор реагентов тест-системы иммуноферментной магноиммосорбентной для выявления возбудителя туляремии», который обеспечивает повышение специфичности и чувствительности ИФА до 10 м.к./мл и достоверность получаемых результатов исследования. При постановке сочетанного метода ИФА+МИС функцию сенсibilизированных микроплат, традиционно используемых в ИФА, выполняет аффинный магносорбент.
5. Впервые разработана технология элюирования антигенов с сохранением их нативности после проведенного селективного концентрирования на аффинном магносорбенте, что дало возможность исследовать материал в таких серологических реакциях как РНГА и РАЛ, при этом используют один из растворов: 1 % раствор пепсина, рН 6,2; 2 % раствор твин 20, рН 5,6; 0,03 М раствор калия едкого, рН 11,4; 60 % раствор ацетонитрила, рН 8,5; ТРИС-ЭДТА буфер, рН 8,9. Разработаны условия многократного использования МИС после десорбции антигена.
6. Разработаны технические устройства для забора проб из объектов окружающей среды с применением МИС: универсальная укладка для забора и транспортировки материала от

людей, животных и из объектов окружающей среды для исследования на особо опасные болезни и радиоуправляемая самоходная и плавающая портативная установка для экологического, эпидемиологического и микробиологического мониторинга объектов водной среды.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При конструировании специфических магноиммуносорбентов для детекции возбудителей инфекций бактериальной и вирусной природы рекомендуется использовать разработанный алгоритм процессов и параметров биотехнологии производства туляреминого магноиммуносорбента.
2. Для повышения чувствительности и специфичности таких серологических реакций как РНГА и РАЛ рекомендуется проведение предварительного избирательного концентрирования искомого патогена на аффинном магносорбенте с последующей десорбцией антигена одним из растворов: 1 % раствор пепсина, рН 6,2; 2 % раствор твин 20, рН 5,6; 0,03 М раствор калия едкого, рН 11,4; 60 % раствор ацетонитрила, рН 8,5; ТРИС-ЭДТА буфер, рН 8,9.
3. Для мониторинговых эпидемиологических обследований природных очагов туляремии рекомендуется использовать «Набор реагентов тест-системы иммуноферментной магноиммуносорбентной» с целью повышения достоверности как положительных, так и отрицательных результатов иммуноферментного анализа.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее усовершенствование методологии лабораторной диагностики туляремии должно быть направлено на проведение исследований по применению магноиммуносорбентов в количественной иммунофлуоресценции, хемилюминисценции, бактериологическом и генетическом методах лабораторного анализа.

Необходимо продолжить исследование по конструированию органокремнеземного магноиммуносорбента с применением в качестве лиганда туляреминых моноклональных антител.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Гаркуша, Ю.Ю.** Разработка метода элюирования антигенов с иммобилизованной магнитной матрицы при постановке ИФА / **Ю.Ю. Гаркуша, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, И.В. Савельева, Е.В. Жданова** // Современные технологии обеспечения биологической безопасности; Оболенск, 25-27 мая 2010 года: матер. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора. – 2010. – С. 263-264.
2. **Гаркуша, Ю.Ю.** Разработка метода элюирования *Francisella tularensis* с иммобилизованной матрицы с последующей постановкой полимеразной цепной реакции / **Ю.Ю. Гаркуша, Д.А. Ковалев** // Современные технологии обеспечения биологической безопасности; Оболенск, 31 мая – 2 июня 2011 года: матер. III науч.-практ. школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора. – 2011. – С. 173-174.
3. **Гаркуша, Ю.Ю.** Разработка методов элюции туляреминых антигенов с иммобилизованной магнитной матрицы / **Ю.Ю. Гаркуша, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Е.В. Жданова** // Современные проблемы военной медицины, обитаемости и профессионального отбора; Санкт-Петербург, 17-18 ноября 2011 года: матер. Всерос. науч.-практ. конф. – 2011. – С. 235-236.
4. **Гаркуша, Ю.Ю.** Подбор реагентов для элюции возбудителя туляремии с магноиммуносорбентной матрицы для последующей постановки индикаторных анализов / **Ю.Ю. Гаркуша, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Е.В. Жданова, С.А. Курчева** // Национальные приоритеты России. Специальный выпуск «Современные аспекты природной очаговости болезней». – 2011. – №2(5). – С. 114.

5. Тюменцева, И.С. Антигены и антитела *Francisella tularensis*: к вопросу иммунодиагностики туляремии / И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Е.В. Алиева, С.А. Курчева, Ю.Ю. Гаркуша // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2012. – № 1(25). – С. 49-52.
6. Курчева, С.А. Туляремия: современное состояние эпидемиологии и лабораторной диагностики (обзор литературы) / С.А. Курчева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Ю.Ю. Гаркуша, О.А. Гнусарева // Ставрополь, 2012. – 51с. – Деп. В ВИНТИ 29.03.2012, № 141-В2012.
7. Гаркуша, Ю.Ю. Подбор реагентов для элюции патогена с магнитоиммосорбентной матрицы / Ю.Ю. Гаркуша, И.В. Жарникова, Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева, С.А. Курчева, Е.В. Жданова // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных; Ставрополь, 23-24 мая 2012 года: матер. Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием, посвященной 60-летию ФКУЗ СтавНИПЧИ. – 2012. – С. 165-166.
8. Гаркуша Ю.Ю. Отработка метода элюирования *Francisella tularensis* с иммобилизованной магнитной матрицы для постановки серологических реакций / Ю.Ю. Гаркуша, Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева, И.В. Жарникова, С.А. Курчева, Е.В. Жданова // Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера; Саратов, 16-17 октября 2012 года: матер. XI Межгосударственной науч.-практ. конференции. – 2012. – С. 59-60.
9. Гаркуша, Ю.Ю. Разработка методов десорбции антигенов инфекционных патогенов с поверхности магнитоуправляемых микроразмерных частиц для их детекции в серологических и генетических исследованиях / Ю.Ю. Гаркуша, Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева, И.В. Жарникова, С.А. Курчева, Е.В. Жданова, О.Л. Старцева // Технологии живых систем. – 2013. – Т. 10, № 5. – С. 51-54.
10. Курчева, С.А. Подбор элюентов для разрыва связи антигена с антителами, иммобилизованными на магнитной матрице, с последующей постановкой ПЦР и оценка эффективности их применения / С.А. Курчева, Ю.Ю. Гаркуша, О.Н. Гнусарева, Д.А. Ковалев // Актуальные проблемы профилактической медицины, среды обитания и здоровья населения; Уфа, 25-27 сентября 2013 года: сборник науч. трудов Всерос. конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора. – 2013. – С. 312-314.
11. Жарникова, И.В. Разработка методов элюции антигенов возбудителя туляремии с поверхности магнитных иммуночастиц для их детекции в серологических реакциях / И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, С.А. Курчева, Ю.Ю. Гаркуша, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова // Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Причерноморском регионе; Ставрополь, 24-25 сентября 2013 года: матер. региональной науч.-практ. конференции с международным участием. – 2013. – С. 98-100.
12. Тюменцева, И.С. Оптимизация системы контроля биотехнологии медицинских иммунобиологических препаратов, выпускаемых ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора [Электронный ресурс] / И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, С.А. Курчева, Ю.Ю. Гаркуша, А.А. Семирчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №6. – Режим доступа: <http://www/science-education.ru/rules/120-16655>.
13. Газиева, А.Ю. Энергия и работа биоспецифического взаимодействия активных центров антител и антигенов (обзор литературы) / А.Ю. Газиева, Д.В. Ефременко, С.М. Кальной, С.П. Дикова, Ю.Ю. Гаркуша, А.Н. Куличенко, И.В. Жарникова // Ставрополь, 2014. – 59 с. – Деп. В ВИНТИ 02.06.14 №157-В2014.
14. Старцева, О.Л. К вопросу разработки стандартного образца композиционного органокремнеземного микрогранулированного магносорбента / О.Л. Старцева, С.А.

Курчева, Ю.Ю. **Гаркуша, А.А.** Семирчева // Матер. Всерос. науч.-практ. конф., посвященной 95-летию ФБУН НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора: Нижний Новгород, 28 мая 2014 года. – 2014. – С. 239-241.

15. **Гаркуша, Ю.Ю.** Унифицированная укладка для забора и транспортировки проб биоматериала и объектов окружающей среды с целью проведения бактериологического исследования / **Ю.Ю. Гаркуша, С.П. Дикова, А.Ю. Газиева, Д.В. Ефременко, С.М. Кальной** // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины; Ставрополь, 22-24 октября 2014 года: матер. VI Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2014. – С. 75-76.

16. Старцева, О.Л. Оптимизация параметров стадии механического измельчения при конструировании стандартного образца магносорбента / О.Л. Старцева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, И.В. Жарникова, Е.В. Жданова, С.А. Курчева, **Ю.Ю. Гаркуша, А.А. Семирчева, А.А. Зуенко** // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены; Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2015 года: матер. VII Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2015. – С.192-193.

17. Старцева, О.Л. Разработка стандартного образца композиционного органокремнеземного микрогранулированного магносорбента и определение стабильности его основных показателей качества при хранении / О.Л. Старцева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, **Ю.Ю. Гаркуша** // Общие угрозы – совместные действия. Ответ Государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней; Москва, 23-24 июня 2015 года: матер. международной конференции. – 2015. – С. 357-359.

18. **Гаркуша, Ю.Ю.** Стандартные условия биотехнологии производства магноиммуносорбентов, используемых в лабораторной диагностике / **Ю.Ю. Гаркуша, О.Л. Старцева, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, С.А. Курчева, Е.В. Жданова** // Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе. Новосибирск, 26-27 сентября 2016 года: матер. науч.-практ. конференции. – 2016. – С. 145-146.

19. **Тюменцева, И.С.** Разработка стандартных условий биотехнологии производства иммуномагнитного сорбента для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний / **И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, О.Л. Старцева, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, Ю.Ю. Гаркуша, Е.В. Жданова, С.М. Кальной** // Технологии живых систем. – 2017. – Т. 14, № 2. – С. 52-54.

20. **Гаркуша, Ю.Ю.** Определение стабильности основных показателей качества стандартного образца магносорбента / **Ю.Ю. Гаркуша, И.С. Тюменцева, С.А. Курчева, О.Л. Старцева, И.В. Жарникова, А.Г. Кошкидько, А.С. Геогджаян** // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. – № 7 (304). – С. 48-51.

#### Изобретения

21. Патент 125 976 Российская Федерация, МПК В65D 88/12. Универсальная укладка для забора и транспортировки материала от людей, животных и из объектов окружающей среды для исследования на особо опасные инфекционные болезни / **С.М. Кальной, Г.И. Лямкин, С.И. Головнева, Д.В. Русанова, Л.С. Катунина, Ю.Ю. Гаркуша**; заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2012127535/12; заявл. 02.07.2012; опубл. 20.03.2013, Бюл. № 8. – 8 с.

22. Патент 133 834 Российская Федерация, МПК С12 М 1/00. Радиоуправляемая самоходная и плавающая портативная установка для экологического, эпидемиологического и микробиологического мониторинга объектов водной среды / **С.М. Кальной, А.А. Зайцев, В.М. Мезенцев, Т.В. Жарникова, А.И. Бондаренко, И.В. Самарина, В.В. Остапович, Ю.Ю. Гаркуша, Д.В. Ефременко, О.А. Гнусарева,**

Т.В. Харченко; заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 20123122182/10; заявл. 14.05.2013; опубл. 27.10.2013, Бюл. № 30. – 9 с.

23. Патент 2 535 070 Российская Федерация, МПК G01N 33/53, G01N 33/569 . Способ элюции патогена с иммобилизованной магнитной матрицы / Ю.Ю. Гаркуша, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, С.А. Курчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова, А.Н. Семирчева; заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2013132033/15; заявл. 10.07.2013; опубл. 10.12.2014, Бюл. № 34. – 5 с.

24. Патент 2 549 971 Российская Федерация, МПК G01N 33/531. Способ консервации иммунопероксидазного конъюгата / А.А. Зайцев, О.А. Гнусарева, С.А. Курчева, Ю.Ю. Гаркуша, И.С. Тюменцева, Т.И. Рыбалко, А.Н. Куличенко; заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2014126682/15; заявл. 01.07.2014; опубл. 10.05.2015, Бюл. № 13. – 5 с.

25. Патент 2 652 231 Российская Федерация, МПК B01J 20/06, B01J 20/16, B01J 20/26, B01J 20/30 . Способ получения стандартного образца магнитного сорбента для конструирования медицинских иммунобиологических препаратов / И.С. Тюменцева, С.М. Кальной, Е.Н. Афанасьев, А.Н. Куличенко, С.А. Курчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова, Ю.Ю. Гаркуша; заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2017103540; заявл. 02.02.2017; опубл. 25.04.2018, Бюл. № 25. – 13 с.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Аг	– антиген
Ат	– антитело
ИФА	– иммуноферментный анализ
КПХ	– конъюгат пероксидазы хрена
МИБП	– медицинские иммунобиологические препараты
МИС	– магноиммуносорбент
МС	– магносорбент
НРИФ	– непрямая реакция иммунофлуоресценции
ООИ	– особо опасные инфекции
ОП	– оптическая плотность
ОСО	– отраслевой стандартный образец мутности (ОСО мутности)
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПХ	– пероксидаза хрена
ПЭГ	– полиэтиленгликоль
РАЛ	– реакция агглютинации латекса
РИД	– реакция иммунодиффузии
РПГА (РНГА)	– реакция пассивной (непрямой) агглютинации
СО	– стандартный образец
ТУ	– технические условия

Ig G – иммуноглобулины класса G  
pH – отрицательный логарифм концентрации водородных ионов  
Rz – показатель соотношения экстинций при длинах волн 280 и 450  
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора – Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека